

Pauliina Hyrkäs ja Janina Söderholm

Influenssa A- ja B-virusten osoitukseen
käytettävän SmartCycler® RT-PCR-
menetelmän validointi ja menetelmävertailu
Actim® Influenza A&B-vieritesttiin

Tekijät	Pauliina Hyrkäs ja Janina Söderholm
Otsikko	Influenssa A- ja B-virusten osoitukseen käytettävän SmartCycler® RT-PCR-menetelmän validointi ja menetelmävertailu Actim® Influenza A&B-vieritestin
Sivumäärä	56 sivua + 5 liitettä
Aika	24.11.2011
Tutkinto	Sosiaali- ja terveysalan ammattikorkeakoulututkinto
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaajat	Lehtori, KM Terttu-Liisa Lindell Erikoistuva kemisti Johanna Westerlund
<p>Influenssavirusepidemioita ja -pandemioita esiintyy maailmanlaajuisesti säännöllisin väliajoin ja usein influenssavirukset aiheuttavat isännälleen voimakkaan hengitystieinfektion. Hoidon oikeellisuuden varmistamiseksi ja epidemioiden kontrolloinnin takaamiseksi on tärkeää kehittää nopeita ja luotettavia tapoja todeta influenssavirusten aiheuttamia infektiota.</p> <p>Opinnäytetyömme tavoitteena on ollut sekä validoida influenssa A- ja B-viruksia tunnistava SmartCycler® RT-PCR-menetelmä että suorittaa menetelmävertailu tutkimamme menetelmän ja vieritestimenetelmän välillä. Toimeksiantajamme Yhtyneet Medix Laboratoriot Oy:n tavoitteena on käyttää kohdemenetelmällämme tehtäviä laboratoriotutkimuksia Actim Influenza A&B-vieritestin (Medix Biochemica) referenssinä.</p> <p>Tutkimuksemme validointiosuudessa hyödynsimme Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitokselta (THL) saatuja, PCR-menetelmällä tutkittuja näytteitä ja menetelmävertailu tehtiin tutkimala vieritestauksen yhteydessä kerättyjä puskuriliuoksia, joista osa sisälsi influenssa A- ja B-viruksia. Kohdemenetelmämme validoinnin osoittaututtua onnistuneeksi käytimme tutkimamme RT-PCR-menetelmää referenssimenetelmänä suhteessa Actim Influenza A&B-vieritestin immunokromatografiseen menetelmään.</p> <p>SmartCycler® RT-PCR -menetelmällä saadut tulokset vastaavat säännönmukaisesti THL:n referenssimenetelmällä saatuja tuloksia, joten työmme validointiosuuden voidaan todeta onnistuneen. Lisäksi menetelmävertailussa todettiin useiden vieritestissä negatiivisiksi tulkittujen näytteiden osoittautuvan RT-PCR-menetelmällä positiivisiksi, mikä tukee ajatusta validoimamme menetelmän tarpeellisuudessa vieritestitulosten varmistamisessa. SmartCycler® RT-PCR -menetelmän voidaan todeta olevan käyttötarkoitukseensa sopiva, sillä validoinnissa tutkitut parametrit: kohdemenetelmän herkkyys, spesifisyys, lineaarisuus, toistettavuus ja luotettavuus, vastaavat hyvin toimeksiantajamme menetelmälle asettamia vaatimuksia.</p>	
Avainsanat	influenssa, RT-PCR, menetelmävalidointi, menetelmävertailu

Authors	Pauliina Hyrkäs and Janina Söderholm
Title	The Validation of the SmartCycler® RT-PCR Method Used For Influenza A and B Diagnostics and a Method Comparison with Actim® Influenza A&B
Number of Pages	56 pages + 5 appendices
Date	24 November 2011
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Terttu-Liisa Lindell, Principal Lecturer Johanna Westerlund, Biochemist (MSc)
<p>Influenza epidemics and pandemics occur worldwide regularly. The influenza virus causes most often a severe respiratory infection in its host. To confirm the right treatment for the infected patients and to guarantee the control of the epidemics, it is important to develop rapid and reliable ways of diagnosing infections caused by influenza virus.</p> <p>The purpose of our study was both to validate the real-time RT-PCR Smart Cyclyer®-analyzer in influenza A and B diagnostics and to perform a comparison between the validated method and a point-of-care test. The validated method is unique confirming its sample material, while our principal Yhtyneet Medix Laboratoriot Oy will utilize and market the diagnostic test as a reference method for the point-of-care test Actim® Influenza A&B.</p> <p>In the validation part of our study, we used samples analyzed with a PCR method and gathered at the Finnish National Institute of Health and Welfare (THL). The method comparison was carried out on buffered samples collected during point-of-care testing. While the validation turned out to be successful, we used the validated RT-PCR method as a reference method regarding the immunochromatographic method in the Actim® Influenza A&B point-of-care test.</p> <p>Our results showed that the SmartCycler® RT-PCR method corresponded regularly to the THL reference method, and therefore the validation part of our study can be considered successful. Moreover, in the method comparison we found a few samples that had been interpreted as negative for influenza in the point-of-care test to be positive with the RT-PCR method. This result supported the idea of using the studied and validated method as a reference for ensuring the results of the point-of-care test. The SmartCycler® is suitable for the intended use, while its high sensitivity, specificity, linearity, repeatability and reliability responded to the needs of Yhtyneet Medix Laboratoriot Oy.</p>	
Keywords	influenza, RT-PCR, method validation, method comparison

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Influenssavirukset	2
2.1	Influenssa A- ja B-virukset	4
2.2	Influenssavirusten laboriodiagnostiikka	6
3	Menetelmät	9
3.1	NucliSens® easyMAG®-nukleiinihappoeristys	9
3.1.1	Nukleiinihappojen eristyksen tarkoitus	10
3.1.2	Eristysautomaatin toimintaperiaate	10
3.2	SmartCycler® RT-PCR	11
3.2.1	Menetelmän periaate	12
3.2.2	Reaktion vaatimat reagenssit	13
3.2.3	Tulosten detektointi reaaliajassa	15
3.2.4	Laadunvarmistus	17
3.3	Actim® Influenza A&B-antigeeniosoitus	19
3.3.1	Testin periaate	19
3.3.2	Testin suoritus	20
3.3.3	Testin tulosten lukeminen	20
4	Menetelmävalidointi	21
4.1	Validoinnin raportointi	23
4.2	Validoinnissa määritettävät parametrit	24
5	Tutkimusasetelma	26
5.1	Aikaisemmat tutkimukset	27
5.2	Työtä ohjaavat kysymykset	30
6	Opinnäytteen suoritus	31
6.1	Näytemateriaali	31
6.1.1	Validoinnissa käytetyt referenssinäytteet	31
6.1.2	Menetelmävertailussa käytetyt vieritestinäytteet	32
6.2	Työn suoritus	33
6.2.1	Näytteiden esikäsittely ja nukleiinihappojen eristäminen	34
6.2.2	Reagenssiseoksen valmistus	36
6.2.3	Monistaminen SmartCycler®-laitteella	37
7	Tutkimustulokset	38
7.1	Validoinnin tulokset	38
7.1.1	Kvalitatiivinen herkkyys ja spesifisyys	38

7.1.2	Toistettavuus ja uusittavuus	40
7.1.3	Oikeellisuus	41
7.1.4	Lineaarisuus	41
7.2	Menetelmävertailun tulokset	44
8	Tulosten luotettavuuden arviointi	46
9	Pohdinta	49
	Lähteet	53
Liitteet	Liite 1. Yhtyneet Medix Laboratoriot Oy:n laatima validointisuunnitelma	
	Liite 2. SmartCycler® RT-PCR-sarjat	
	Liite 3. Qiagen® One-Step RT-PCR-reagenssipakkauksen sisältö	
	Liite 4. Smart Cycler® RT-PCR-tulosten signaalikäyrät	
	Liite 5. Smart Cycler® RT-PCR-tulokset sarjoittain	

1 Johdanto

Influenssa-aihetta on käsitelty lähiaikoina runsaasti maailmanlaajuisten influenssa A-viruspandemioiden sekä vuosittain esiintyvien influenssaviruksen A- ja B-muotojen aiheuttamien epidemioiden vuoksi. Tartuntoja seuraavien, rajujenkin hengitystieinfektioiden esiintyminen lisää kiinnostusta influenssavirusten ominaisuuksia ja virusdiagnostiikan kehitystä kohtaan: diagnostiikkaa palvelevien laboratoriomenetelmien kehittäminen sekä sujuvaan näytteenottoon panostaminen on tärkeää infektioiden torjunnassa sekä epidemiatilanteen valvonnassa. Erityisesti pandemioita aiheuttavat virustyyppit on syytä osoittaa mahdollisimman nopeasti, sujuvasti ja luotettavasti, jolloin influenssatartuntojen määrää voidaan samalla hillitä potilaiden hoitokäyntien lyhentymisen ja vähentymisen kautta. Näiden tavoitteiden saavuttamiseksi laboratoriopalveluja tuottavien tahojen on kyettävä varmistamaan influenssadiagnostiikkaan käyttämiensä menetelmien sujuvuus ja oikeellisuus: menetelmien korkea spesifisyys ja herkkyys sekä potilaan hoidon aloittamisen kannalta kohtuullinen vastausviive.

Teemme opinnäytetyömme Yhtyneet Medix Laboratoriot Oy:n toimeksiannosta. Työn tarkoituksena on osoittaa kaupallisen SmartCycler® RT-PCR-menetelmän käytettävyys influenssadiagnostiikassa referenssinäytteiden avulla sekä verrata kyseistä menetelmää Actim® Influenza A&B-vieritestiin. Näyttemateriaalina käytämme työssämme referenssilaboratoriossa (Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitoksella) PCR-menetelmällä tutkittuja näytteitä sekä antigeeniosoitusta varten kerättyjä potilasnäytteitä. Opinnäytetyömme ohjaajina toimivat Metropolia ammattikorkeakoulun bioanalytiikan koulutusohjelman lehtori KM Terttu-Liisa Lindell ja Yhtyneet Medix Laboratoriot Oy:ssä toimiva erikoistuva kemisti Johanna Westerlund.

Tutkimuksemme ensimmäisessä vaiheessa testattavan näytteen sisältämä RNA eristetään bioMérieux:n NucliSens® easyMAG®-laitteistolla, minkä jälkeen eristetty influenssaviruksen RNA muokataan käänteiskopioijaentsyymin avulla komplementaariseksi DNA:ksi (cDNA). Tämän jälkeen cDNA monistetaan influenssa A- ja B-viruksille spesifisten alukkeiden avulla. RNA:n muokkaamisessa cDNA:ksi ja cDNA:n monistamisessa hyödynnetään niin sanottua one-step-menetelmää (Qiagen). Tutkimamme menetelmän toiminta perustuu TaqMan-periaatteeseen. Monistetut influenssaviruksen nukleinihappo edustavat tuotteet detektoidaan reaaliaikaisesti fluoresoivilla molekyyleillä leimat-

tujen koettimien ja SmartCycler®-laitteiston ohjelmiston avulla.

Opinnäytetyömme pyrkii vastaamaan kysymykseen: onko influenssa A- ja influenssa B-virusten nukleiinihappoja mahdollista määrittää SmartCycler® RT-PCR-menetelmällä suoraan Actim® Influenza A&B-vieritestissä hyödynnetystä testipuskurista ja onko tutkimamme menetelmä tarpeeksi herkkä ja spesifinen diagnostiseen käyttöön. Toimeksiantajamme toivoo kyseistä menetelmää hyödynnettävän tulevaisuudessa rutiinidiagnostiikassa, jolloin asiakkaalta vaadittaisiin vain yksi, vieritestin näytteenoton mukainen näytteenottokerta influenssa A:n tai B:n kvalitatiiviseen osoittamiseen vieritestillä sekä tuloksen varmentamiseen SmartCycler® RT-PCR-menetelmällä.

2 Influenssavirukset

Influenssaviruksilla on negatiivisäikeinen, yksijuosteinen ja jaokkeinen RNA-genomi ja ne kuuluvat ortomyksovirusiin (Huovinen – Hedman – Heikkinen – Järvinen – Meri – Vaara 2010: 470; Poddar – Sawyer – Connor 1998: 1133). Pallomaisen tai soikean viruksen rakenneosia ovat virusgenomin sisältävä nukleokapsidi, sitä suojaava M1-proteiini sekä näiden kahden rakennekerroksen päällä isännän solun kalvorakenteista peräisin oleva lipidivaippa (Huovinen ym. 2010: 470–471).

Influenssaviruksia tunnetaan A-, B- ja C-tyyppejä (Wang – Tao 2010: 29; Huovinen ym. 2010: 470). Influenssa A- ja B-viruksilla genomien jaokkeita on kahdeksan ja influenssa C-viruksella seitsemän. Influenssa A- ja B-virusten kahdeksan geenisegmenttiä koodaavat 10–11 tunnettua proteiinia. Suurin osa influenssa A- ja B-virusten pintaproteiineista on neuraminidaasi- ja hemagglutiniini-glykoproteiineja (Huovinen ym. 2010: 470–472), joiden erot patogeenisyyksilöiden välillä määräävät pääasiassa virusten serologisen jaon eri alatyyppeihin (Van Tam – Shellwood 2009: 3, Huovinen ym. 2010: 470).

Hemagglutiniinin (HA) tehtävänä on tunnistaa isännän solujen kalvoissa olevia reseptoreja ja avustaa nukleokapsidia vapautumaan virusrakenteista isäntäsolun sisällä. Neu-

raminidaasin (NA) tehtävänä on irrottaa hemagglutiniini edellä mainituista reseptoreista ja siten vapauttaa influenssavirus isäntäsolusta viruksen lisääntymisen jälkeen. (Huovinen ym. 2010: 471–472.) Hemagglutiniinin muunteluun perustuvia influenssavirusten alatyyppejä tunnetaan 16 ja neuraminidaasin muunteluun perustuvia 9. Influenssavirusten geeniperimän heterogeenisuus aiheuttaa virusten genomien sekvenssien vaihtelun eri virustyyppien välillä, samoin kuin yksittäisen tyypin sisällä (Dorak 2006: 234). Tällainen antigeenievoluutioon perustuva muuntelu johtuu viruksen RNA-polymeraasin tekemistä lukuvirheistä sen monistaessa viruksen genomia ilman oikolukuaktiivisuutta (Huovinen ym. 2010: 474).

Monet infektiot voivat kulkeutua selkärangaisista eläimistä ihmisiin ja osa näistä infektiosta on influenssavirusten aiheuttamia. Infektion aiheuttajat kulkeutuvat uuteen isäntään yleisimmin ihon, silmien tai hengitysteiden kautta. Eri isännissä virukset voivat muuntautua, synnyttää vastustuskykyisempiä kantoja ja mukautua muuttuvaan ympäristöön viruksen kannalta tarkoituksenmukaisen valinnan kautta. (Viljoen – Nel – Crowther 2005: 13.)

Influenssavirukset aiheuttavat hengitystieinfektioita, jotka hoitamattomina voivat johtaa jopa kuolemaan (Cheng ym. 2004: 85.) Lapsilla kyseiset virukset aiheuttavat suuren osan ylempien ja alempien hengitysteiden infektiosta, joista seurauksena potilaille kehittyä esimerkiksi keuhkokuume. Immuunipuutteisille sekä iäkkäille virus on merkittävä sairastuneisuuden ja kuolleisuuden aiheuttaja. (Templeton – Scheltinga – Beersma – Kroes – Claas 2004: 1564, 1567.) Influenssan aiheuttaman infektion tyypillisiä oireita ovat yskä, nopeasti nouseva korkea kuume sekä sairaudentunne. Oireet ilmenevät kuitenkin yksilöllisinä ja siksi sairaus voi olla kliinisesti vaikeaa erottaa muiden patogeeni- en aiheuttamista infektiosta. Influenssa-infektion oireet kestävät noin viisi päivää, mutta väsymyksen tunne saattaa jäädä potilaalle useiksi viikoiksi muiden klinisten oireiden jo väistyttyä. (Van Tam – Shellwood 2009: 3; Huovinen ym. 2010: 481.)

Epidemian aikana 5-20 % väestöstä saa influenssavirustartunnan (Huovinen ym. 2010: 470) ja pandemioiden yhteydessä väestön sairastavuus voi nousta 30–50 prosenttiin (Huovinen ym. 2010: 470, 477). Pandemiat ovat seurausta virusten risteilystä eri isäntien välillä (Dorak 2006: 235) ja tästä seuraavasta viruksen jyrkästä antigeenimuutoksesta (engl. antigenic shift), jolloin immunitetti muuntunutta virusta vastaan puuttuu

pahimmillaan lähes koko maapallon väestöltä. Pienemmät antigeeniset muutokset (engl. antigenic drift) taas aiheuttavat pandemioiden välivuosina esiintyviä epidemioita. Erityisesti riskiryhmiin kuuluvien henkilöiden rokottaminen on tärkeää tavoiteltaessa taudin ehkäisyä ja kontrollointia, mutta sekä influenssadiagnostiikkaan käytettäviä menetelmiä että infektioita ehkäiseviä rokotteita on kehitettävä jatkuvasti viruksen muuntautumiskyvyn takia. (Huovinen ym. 2010: 470–483.)

Jatkuva kattava valvonta on tärkeää influenssavirusten aiheuttamien sairauksien torjunnassa (Effler – Jeong – Tom – Nakata 2002: 23, 27). Maailman terveysjärjestö (WHO) sekä useat kehittyneet maat ovat itsenäisesti laatineet influenssapandemioiden torjumiseksi ja niihin varautumiseksi suunnitelman, jonka avulla pandemian uhan yhteydessä osataan tarpeen mukaan nostaa varautumistasoa ja siten toimia mahdollisimman tarkoituksenmukaisella tavalla laajojen epidemioiden torjumiseksi (Huovinen ym. 2010: 480). Suomessa Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitos (THL) ylläpitää tartuntatautirekisteriä, johon dokumentoidaan kuukausittain ilmenevät influenssavirusten aiheuttamat tartunnat (Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitos 2011).

2.1 Influenssa A- ja B-virukset

Influenssavirukset A ja B aiheuttavat kausittaisia epidemioita ja A satunnaisia pandemioita hengitystieinfektioiden muodossa (Subbarao – Katz 2004: 314). Influenssa A- ja B-virusten ajatellaan olevan pääpatogeenit puhuttaessa kausi-influenssasta. Niiden aiheuttamat infektiot on kliinisesti haastavaa erottaa, vaikkakin B-virusta vaikuttaa esiintyvän enemmän lapsiväestössä kuin aikuisilla. Tämä ilmiö on yhteydessä influenssa B-viruksen suurempaan stabiiliteettiin verrattuna influenssa A-virukseen: lapsena sairastettu infektio voi tuottaa pitkäaikaisen immuniteetin. Silti sekä influenssa A- että influenssa B-infektion uusiutuminen on mahdollista. (Van Tam – Shellwood 2009: 3.)

Maailmanlaajuisesti influenssavirustartuntoja on havaittu esiintyvän ympäri vuoden. Influenssaepidemiat esiintyvät pohjoisella pallonpuoliskolla yleensä talvikuukausien aikana ja kesäkuukausina influenssavirustartuntoja tavataan vähiten. (Van Tam 2009: 4; Huovinen ym. 2010: 474.) Epidemiavirukset ovat yleisimmin peräisin Kaakkois-Aasiasta (Huovinen ym. 2010: 474) ja vaikka epidemian aiheuttaja vaihtelee vuosittain, yleensä influenssa A- tai influenssa B-epidemia esiintyy kauden aikana voimakkaampa-

na. Tällainen esiintyminen ei kuitenkaan ole säännönmukaista, vaan influenssan eri muodot voivat ilmaantua epidemiakausien aikana myös rinnakkain (Van Tam – Shellwood 2009: 4). Pohjoisella pallonpuoliskolla influenssa B-virusta esiintyy usein epidemiakauden lopulla influenssa A-viruksen päinvastoin aloittaessa kauden (Van Tam – Shellwood 2009: 4; Huovinen ym. 2010: 476). Eniten influenssaan sairastuu lapsia ja nuoria aikuisia (Huovinen ym. 2010: 475). Vakavaan infektiin sairastuvat ovat yleensä yli 65-vuotiaita, pieniä lapsia tai henkilöitä, joilla on jokin yleiskuntoa heikentävä perussairaus (Subbarao – Katz 2004: 314).

Influenssa A-virus kykenee infektoimaan ihmisen lisäksi useita eläinlajeja. Villinä luonnossa esiintyvät vesilinnut toimivat influenssa A-viruksen varantona – kaikki influenssa A-viruksen alatyypit ovat vesilintujen viruksia ja vain harvat ihmisen viruksia. Influenssa A-virus eriytyi influenssavirusten yhteisestä kantamuodosta noin 2000 vuotta sitten ja eristettiin ensimmäisen kerran ihmisestä vuoden 1933 jälkeen. Viruksen glykoproteiinirakenneosa hemagglutiniinin 16 erilaista ja neuraminidaasin 9 erilaista muotoa voivat muodostaa erilaisia yhdistelmiä ja näiden uusien kombinaatioiden perusteella influenssa A-virukset jaetaan alatyyppeihin, esimerkiksi H1N1- ja H3N2-alatyyppeihin. Uudenlaisten influenssavirusten synty edellyttää, että kaksi eri tyyppiä edustavaa virusta infektoi saman solun ja näin virusten genomin rakenteiden on mahdollista muodostaa uusia yhdistelmiä. (Huovinen ym. 2010: 473, 467–477.)

Influenssa A-viruksen alatyypin H3N2 havaittiin ensimmäisen kerran vuonna 1968 ja 1990-luvulta lähtien H3N2-virusten aiheuttamat epidemiat ovat olleet vakavampia, kuin influenssa A-viruksen alatyypin H1N1 ja influenssa B-virusten aiheuttamat epidemiat. Suomessa H3N2-alatyyppejä on tavattu sen ensimmäisen ilmaantumisen jälkeen lähes joka vuosi. Vuonna 1977 influenssa A-viruksen alatyypin H1N1 havaittiin ensimmäistä kertaa 20 vuoteen, minkä jälkeen sen aiheuttamia infektoita on tavattu säännöllisesti. H1N1-epidemiaan sairastuneet ovat tähän mennessä olleet yleensä lapsia tai nuoria aikuisia. Epidemiat eivät yleensä ole laajuudeltaan H3N2-epidemioiden veroisia, eikä H1N1-tyypin aiheuttamia epidemioita ole esiintynyt läheskään vuosittain. (Subbarao – Katz 2004: 314; Huovinen ym. 2010: 475–476.)

Influenssa B-virukset ovat muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta ihmisen patogeeneja ja niiden arvioidaan eriytyneen influenssavirusten kantamuodosta noin 4000 vuotta

sitten. Toisin kuin influenssa A-virusten, influenssa B-virusten ei ole havaittu aiheuttaneen pandemioita (Huovinen ym. 2010: 473, 476).

2.2 Influenssavirusten laboratoriodiagnostiikka

Virusdiagnostiikassa voidaan etsiä infektiivistä virusta, viruspartikkeleita, osoittaa viruksen antigeeneja tai perimän osia sekä tutkia virusta vastaan muodostuneita vastaaineita (Louie – Kitano – Brock – Derlet – Kost 2009: 194; Viljoen ym. 2005: 14). Diagnostiikka voidaan siis suunnata osoittamaan patogeenin olemassaolo tai puuttuminen tutkittavasta näytteestä. Vaihtoehtona on myös osoittaa tietyn patogeenin aiheuttama immunologinen vaste tai patologinen vaikutus elimistössä (Viljoen ym. 2005: 14). Virusten aiheuttamien oireiden luonne sekä käytettävissä olevat menetelmät vaikuttavat siihen, mitä tutkimuksia tai tutkimusyhdistelmiä käytetään. Myös näytteen laatu vaikuttaa tutkimusmenetelmän valintaan. Tietyt virukset lisääntyvät vain tietyissä soluissa ja kudoksissa, joten näyttemateriaalin tulisi olla sieltä, missä virus aiheuttaa oireita lisääntyessään. (Ulmanen 2010: 25.)

Influenssavirusten laboratoriodiagnostiikkaa tarvitaan erityisesti epidemioiden ja niiden aiheuttajien tunnistamiseen, kliinisesti epäselvien tapausten ratkaisemiseen sekä uusin virusmuunnosten etsimisessä (Louie ym. 2009: 193; Huovinen ym. 2010: 486). Diagnostiikasta haasteellista tekee kuitenkin se, että monia virustyyppejä saattaa esiintyä väestössä samanaikaisesti ja näin ollen kliinisissä laboratorioissa tulisi olla valmius useiden eri virustyyppien osoittamiseen (Dorak ym. 2006: 234). Perinteisesti hengitysteiden virusinfektioiden diagnostiikka on toteutettu virusviljelmästä tehtyyn eristykseen ja immunofluoresenssiin perustuvien menetelmien avulla (Greenberg – Allen – Wilson – Atmar 2002: 201). Virusviljely on kuitenkin vaativa menetelmä, jossa virus on säilyttävä infektiivisenä näytteenoton jälkeen. Siksi näyte on saatava nopeasti laboratorioon, missä se käytetään kasvatusalustan infektointiin. (Ulmanen 2010.) Perinteistä tutkimusmenettelyä on pidetty virusdiagnostiikan ”kultaisena standardina”, vaikkakin hitaus asettaa rajoitteita sen käyttömahdollisuuksille (Templeton ym. 2004: 1564) – tulosten valmistuminen kestää kahdesta kahdeksaan päivään ja siksi menetelmä ei ole optimaalinen valinta akuutin infektion yhteydessä (Greenberg ym. 2002: 201).

Vieritestien ja PCR-menetelmien käyttö diagnostiikassa on parantanut ymmärrystä

akuuttien hengitystieinfektioiden syistä sekä epidemiologiasta (Greenberg ym. 2002: 201). Kaupalliset, useimmiten immunologiaan ja influenssavirusten antigeenien osoitukseen perustuvat vieritestit tarjoavat mahdollisuuden nopeampaan influenssan diagnosointiin (Effler ym. 2002: 23; Ghebremedhin – Engelmann – König – König 2009: 365; Louie ym. 2009: 196) ja ne on otettu laajalti käyttöön rutiinidiagnostiikassa. Vieritestien ehdoton hyöty on testin helppo saatavuus ja nopea suoritus (Ghebremedhin ym. 2009: 365; Louie ym. 2009: 193). Toisaalta puutteena on havaittu niiden kykenemättömyys tyypittää influenssavirusten alatyyppejä (Effler ym. 2002: 23), mikä on mahdollista käytettäessä nukleinihappomonistukseen perustuvaa PCR-menetelmää.

Vieritestissä on havaittu puutteita herkkyiden ja spesifisyyden suhteen ja siksi siitä saatu negatiivinen tulos vaatii usein PCR-referenssimenetelmällä tehtävän varmistuksen (Templeton ym. 2004: 1564, 1567). Antigeeniosoitustestin käytön tavoitteina on määrittää infektion aiheuttaja ja sulkea pois muita hengitysteiden patogeeneja. Testin tuloksen perusteella kyetään myös usein valitsemaan oikeanlainen lääkitys infektion hoitoon. Antigeenitestit voivat joko tunnistaa ja erotella influenssa A- ja B-viruksia, tunnistaa, muttei erotella A- ja B-viruksia tai tunnistaa vain influenssa A-virusta. Testit eroavat toisistaan lisäksi näyttemateriaalivaatimusten sekä tulosten saannin nopeuden suhteen. (Ghebremedhin ym. 2009: 365.)

PCR-menetelmien etuna on niiden herkkyys. PCR-menetelmän on havaittu olevan vieritestejä spesifisempi ja herkempi hengitysteiden virusinfektioiden diagnostiikassa ja lisäksi sillä voidaan osoittaa suurempi taudinaiheuttajien valikoima. Nämä eri taudinaiheuttajalajeja ja -tyyppejä edustavat patogeenit voivat aiheuttaa hyvin samanlaisia kliinisiä oireita ja siksi niiden aiheuttamien sairauksien diagnosoinnissa on käytettävä erottelukykyisiä menetelmiä. (Templeton ym. 2004: 1564.) Molekyyli-tason diagnostiikka on keskeisessä asemassa pandemioiden alkuvaiheessa ja influenssavirukset on kyettävä tunnistamaan sekä yksittäisissä että joukkoepidemioissa. Tällaisissa tilanteissa vaaditaan herkkiä, spesifisiä ja nopeita menetelmiä virusten osoittamiseen ja tyypitykseen. Reaaliaikainen PCR on tällä hetkellä sopivin menetelmä näihin tarkoituksiin. (Mackay 2007: 416.)

PCR-menetelmien käyttö on suhteellisen kallista verrattuna virusviljelyyn perustuvaan diagnostiikkaan. Toisaalta reaaliaikaisen PCR-menetelmän käyttö lyhentää laboratorio-

henkilökunnalta analytiikassa vaadittavaa näytteiden käsittelyaikaa, mikä pienentää diagnostiikassa syntyviä kustannuksia. Suurin kustannuksiin liittyvä hyöty saadaan vastausviiveiden ja hoitojaksojen lyhentymisen kautta. Tämä ilmiö pienentää samalla sairaalainfektioiden esiintymisen sekä epätarkoituksenmukaisen antibioottihoidon aloittamisen mahdollisuutta. Samanaikaisesti detektoitavia kohdeyhdistelmiä voidaan ja on tarkoituksenmukaista suunnitella eri epidemiakausien piirteiden mukaisesti. Multiplex real-time PCR on reaaliaikaisen PCR:n sovellus, jonka avulla voidaan samanaikaisesti osoittaa esimerkiksi sekä influenssa A- että B-virusten nukleiinihapporakenteita. Menetelmän käyttö mahdollistaa nopeasti saatavat, herkkyydeltään ja spesifisyydeltään laadukkaat tulokset ja parantaa diagnostiikan lisäksi virusinfektioista johtuvien potilastapausten hallintaa. (Templeton ym. 2004: 1568.)

PCR-menetelmät pyritään kehittämään siten, että tunnetut tai merkittävimmät influenssaviruksen muodot kyetään osoittamaan saman reaktion aikana ja tähän tarkoitukseen multiplex PCR-menetelmä sopii hyvin. Influenssavirusten muuntuessa diagnostisia menetelmiä joudutaan kuitenkin jatkuvasti kehittämään kuluvia pandemia- ja epidemia-kausia vastaaviksi. (Dorak ym. 2006: 235.) Diagnostiikan oikeellisuuden vahvistavan referenssitestauksen on oltava mahdollista kaikille erityisesti pandemia-aikoina influenssavirusten diagnostista analytiikkaa harjoittaville laboratorioille, jotta varmistetaan tulosten korkeasta luotettavuustasosta. (Mackay 2007: 416.)

Influenssavirusten diagnostisessa osoittamisessa voidaan näytteinä käyttää näytteenototikulla otettuja nenä- ja nielueroitteita, mutta myös imulimanäytteet ovat käyttökelpoisia. Nämä näytetyypit soveltuvat lähtömateriaaliksi virusten diagnostiikassa yleisimmin käytössä oleviin menetelmiin, kuten virusviljelyyn sekä virusten antigeenien ja nukleiinihappojen osoittamiseen. Imulima- ja huuhdosnäytteitä otettaessa on kuitenkin huomioitava, että tällaisessa näytteenotossa syntyy helpommin tautia levittäviä aerosoleja. Siksi näytteen ottaminen tikulla on suositeltavampaa. (Louie ym. 2009: 194.)

Virusdiagnostiikkaa varten otetut näytteet tulisi ottaa infektion varhaisessa vaiheessa, koska virusten määrä eritteissä vähenee jo muutamien päivien sisällä alkuaireiden ilmaantumisesta (Hedman ym. 2010: 486). PCR-menetelmiä käytettäessä näyttemateriaalin laatu ei ole tutkittavan materiaalin määrästä vaan puhtaudesta riippuva, sillä tutkimuksissa detektoituu herkästi myös näytteen ulkopuolinen geenimateriaali. Menetel-

män herkkyys asettaa vaatimuksia myös näytteen käsittelylle, joten näytteenotto on suoritettava erityisen aseptisesti. Lisäksi näyteputkia käsitellessä käytetään suojakäsineitä, eikä putkia avata turhaan ennen analysointia. (Ulmanen 2010: 26.)

3 Menetelmät

Opinnäytetyömme tutkimuksessa käytämme kahta influenssavirusten nukleiinihapon detektoimiseen vaadittavaa menetelmää. Ensin näyttemateriaalin sisältämä virusten nukleiinihappo eristetään NucliSens® easyMAG®-eristysautomaatin magneettipartikkelien käyttöön perustuvan menetelmän avulla ja tämän jälkeen tutkimiamme influenssa A- ja B-virusia osoittavat genomien alueet monistetaan SmartCycler® RT-PCR-menetelmää hyödyntäen. Kolmas tässä luvussa esitelty menetelmä liittyy menetelmävertailussa käyttämämme näyttemateriaalin alkuperään: tässä yhteydessä käytettävä näyttemateriaali on uutettu immunokromatografiseen antigeeniosoitusmenetelmään perustuvan Actim® Influenza A&B-vieritestin puskuriliuokseen.

3.1 NucliSens® easyMAG®-nukleiinihappoeristys

BioMérieuxin valmistama NucliSens® easyMAG®-eristysautomaatti on monipuolinen ja helppokäyttöinen nukleiinihappojen eristysautomaatti, jolla voidaan eristää sekä RNA:ta että DNA:ta erilaisista näyttemateriaaleista. Yhdellä ajosarjalla voidaan eristää nukleiinihapporakenteet 1–24 näytteestä. Näytteiden määrä ja eluointivolyymi voidaan säätää ajosarjan sisällä. (bioMérieux 2011.)

Eristykseen sisältyvät manuaaliset vaiheet sisältävät näytteiden, reagenssien ja kertakäyttöisten erityskasettien lataamisen laitteeseen sekä jätesäiliön tyhjentämisen sen täyttyessä. Eristyksen yhteydessä käytetään kolmea eristyspuskuria sekä yhtä lysoivaa puskuria. Näyttemateriaalin lysoinnin voi suorittaa joko manuaalisesti tai easyMAG®-eristyslaitteen automaation avulla. Näyttemateriaalin lysointi laitteella ennen varsinaista eristystä kestää noin 10 minuuttia ja täyden ajosarjan eristäminen noin 40 minuuttia. (bioMérieux 2011.)

Eristysprosessi perustuu magneettisten silikapartikkeleiden kykyyn sitoa nestemäisessä biologisessa näytteessä olevaa nukleiinihappoa. (Loens – Bergs – Ursi – Goossens – Ieven 2007: 421.) Eristysautomaatti on suljettu laite, mikä pienentää mahdollisuutta näytteiden väliseen ristikontaminaatioon (Yang ym. 2010: 198).

3.1.1 Nukleiinihappojen eristuksen tarkoitus

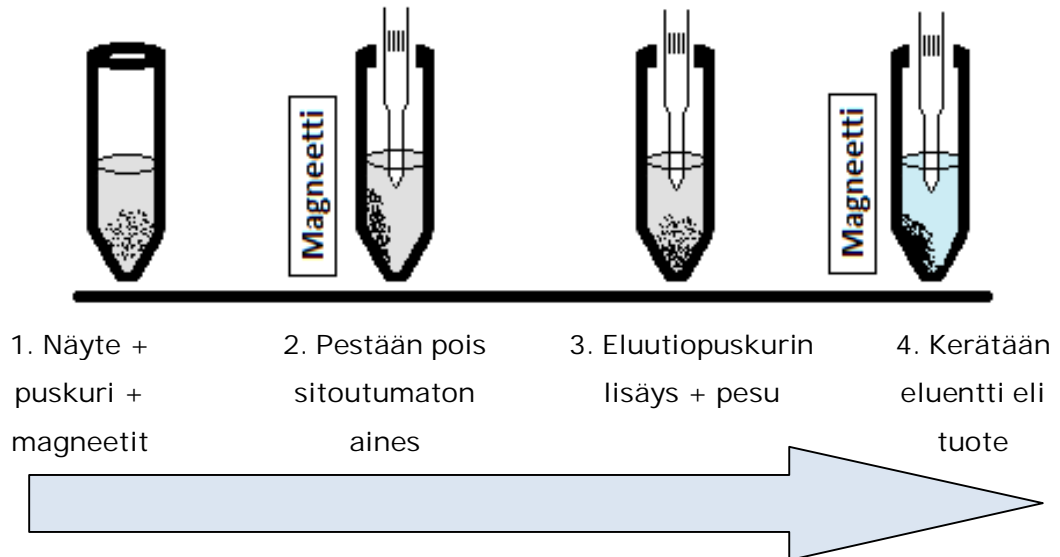
Tutkittavan näytemateriaalin nukleiinihappojen eristäminen ja puhdistaminen ympäröivästä soluaineksesta ja epäpuhtauksista on keskeinen työvaihe ennen nukleiinihapon jatkokäsittelyä (Suominen – Ollikka 2003: 61). Eristysprosessin aikana nukleiinihappoihin kiinnittyneet proteiinit irtoavat ja solujen sisältämät nukleiinihappoja hajottavat entsyymit poistetaan (Ulmanen – Tenhunen – Yläne – Valste – Viitanen 2000: 70). Nukleiinihappojen eristämiseen on olemassa monta erilaista menetelmää – eristettävän nukleiinihapon käyttötarkoitus sekä näytteen alkuperäinen määrä vaikuttavat eristysmenetelmän valintaan (Suominen – Ollikka 2003: 61; Suominen – Pärssinen – Haajanen – Pelkonen 2010: 109).

Automatisoitu nukleiinihappomonistus on kirjallisuudessa todettu herkkyydeltään vastaavaksi tai jopa paremmaksi verrattuna manuaaliseen eristykseen (Loens ym. 2007: 423). Automatisoidut ja luotettavat menetelmät nukleiinihappojen eristämiseksi ovat kliinisessä diagnostiikassa tärkeitä, mikäli halutaan analysoida suurempi määrä näytteitä lyhyemmässä ajassa (Chan ym. 2008: 2195; Yang ym. 2010: 195). Eristettyjen nukleiinihappojen määrä ja laatu vaikuttavat suoraan PCR:n toimintakykyyn (Yang ym. 2010: 195).

3.1.2 Eristysautomaatin toimintaperiaate

NucliSens easyMAG®-eristysautomaatissa nestemäinen näyte sekoittuu kaotrooppista eli denaturoivaa ainetta sisältävän puskurin kanssa, jolloin kaikki soluaines rikkoutuu (engl. lysis). Samalla aktiiviset RNAsit inaktivoituvat. Solujen rikkoutumisen myötä näytteessä olevat influenssavirusten nukleiinihapot vapautuvat puskuriin. Puskurin korkeassa suolapitoisuudessa magneettisten silikapartikkelien lisäys aiheuttaa vapaana olevien nukleiinihappojen sitoutumisen. Sitoutumisen jälkeen silikapartikkelit pestään toistuvasti kahta eri pesupuskuria käyttäen. Puhdistettu nukleiinihappo eluoidaan hyödyntäen reaktioseoksen pH:ta nostavaa puskuriliuosta. Eristyksen viimeisessä vaihees-

sa magneettiset silikapartikkelit poistetaan liuoksesta ennen nukleiinihappojen monistusta. (EasyMAG User Manual.) Alla olevassa kuviossa havainnollistetaan magneettisten silikapartikkeleiden eristysperiaate (kuvio 1).



Kuvio 1. Nukleiinihappojen puhdistus ja eristys magneettipartikkelien avulla. (Mukaillen: EasyMAG User Manual.)

3.2 SmartCycler® RT-PCR

SmartCycler® on Cepheidin valmistama automaattinen PCR-laite, jolla voidaan detektoida monistetut tuotteet reaaliajassa. Laitteen ominaisuudet mahdollistavat kolmen PCR-sovelluksen yhtäaikaisen käytön ajon aikana: RNA-tuotteen käänteiskopioinnin komplementaariseksi DNA:ksi ja jopa neljän tuotteen monistuksen ja detektoinnin reaaliajassa. Yhden reaktion aikana on mahdollista monistaa 16 näytettä erillisissä näyteputkissa. Laitevalmistajan patentoimia, suljettuja näyteputkia käyttämällä ristikontaminaation riski pienenee merkittävästi. (Cepheid 2011a.)

SmartCycler®-laitteen optinen osa mahdollistaa eri aallonpituuksia edustavien fluoresenssisignaalien detektoinnin neljässä eri kanavassa fotodetektorien avulla (Dorak 2006: 16–17). Opinnäytetyössämme monistettava templaatti ja sisäinen monistuskontrolli detektoidaan siten, että ensimmäisessä kanavassa detektoidaan FAM, toisessa Alexa Fluor 532, kolmannessa Texas Red® ja neljännessä Alexa 637. (Cepheid 2011a.)

3.2.1 Menetelmän periaate

Polymeraasiketjureaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) perustana ovat polymeraasientsyymien käyttö sekä reaktioseoksen lämpötilan tarkka kontrollointi. PCR-menetelmän käytön tavoitteena on monistaa nukleiinihappojaksoja, jotka ovat kahden nukleotidijärjestykseltään tunnetun DNA-jakson välissä. (Holland ym. 1991: 7276; Suominen ym. 2010: 153.) PCR-reaktio koostuu toisiaan seuraavista sykleistä, joista jokainen sisältää denaturointi- (engl. denaturation), kiinnittymis- (engl. annealing) ja pidennysvaiheen (engl. extension). Siirtyminen syklin vaiheesta toiseen tapahtuu reaktioseoksen lämpötilaa muuttamalla ja niinpä PCR-laite ohjelmoidaan tutkimuskohtaisesti kontrolloimaan reaktioseoksen lämpötilaa. (Suominen ym. 2010: 154–155.)

RT-PCR (engl. reverse transcription PCR) on herkin menetelmä havainnoitaessa alun perin RNA-muodossa olevan genomin läsnäoloa reaktioseoksessa. Koska RNA ei kykene toimimaan templaattina sellaisenaan, se on muokattava ensin komplementaariseksi DNA:ksi (cDNA) käänteiskopioijaentsyymien avulla. Tätä muokkaustapahtumaa ja sitä seuraavaa tutkittavan genomin osan monistusta kutsutaan RT-PCR:ksi. Käänteiskopionnin jälkeen reaktioseoksessa on sopivaa materiaalia PCR:n monistavia syklejä varten. (Bustin 2000: 169–170.)

Smart Cycler® RT-PCR on niin sanottu "one-step"-menetelmä, jossa RNA-templaatin käänteiskopiointi ja cDNA:n monistus tapahtuvat samassa RT-PCR-reaktiossa. RT-PCR:n alussa reaktioseoksen lämpötila nostetaan 50 °C-asteeseen, jolloin käänteiskopioijaentsyymit aktivoituvat ja suorittavat RNA-molekyyleistä koostuvien templaattien käänteiskopioinnin komplementaariseksi DNA:ksi (cDNA). Tämän jälkeen reaktioseoksen kuumennus 95 °C-asteeseen saa aikaan seoksessa olevan cDNA:n nukleiinihappojen vastinnauhojen irtaantumisen toisistaan eli denaturaation. Lämpötilan nosto vaikuttaa myös reaktioseoksessa oleviin entsyymeihin niin, että käänteiskopioija inaktivoituu ja HotStarTaq DNA-polymeraasi aktivoituu. (Qiagen 2010.)

Kun lämpötilaa tämän jälkeen hetkellisesti lasketaan 60 °C-asteeseen, reaktioseoksessa olevat alukkeet kiinnittyvät niille komplementaariseen kohtaan edellyttäen, että reaktioseoksessa esiintyy tämän ehdon täyttävää templaattia. Kiinnittymisreaktion mahdollistaa se, että templaatti ei pituutensa vuoksi ehdi kokonaan renaturoitua eli palautua

takaisin kolmiulotteiseen muotoonsa lämpötilaa laskettaessa toisin kuin lyhyemmät, reaktioseokseen lisätyt alukkeet. Kiinnittymisvaiheen jälkeen reaktioseoksen lämpötilaa nostetaan jälleen 72 °C-asteeseen, jolloin reaktioseoksessa oleva HotStarTaq DNA-polymeraasi alkaa liittää nukleotideja (dNTP) alukseen 3'-päästä lähtien mukaillen templaatin sisältämää nukleotidijärjestystä. Tämän pidennysvaiheen jälkeen reaktioseos kuumennetaan jälleen 94 °C-asteeseen eli suoritetaan uusi denaturaatio; uusi sykli alkaa. (Suominen ym. 2010: 154; Qiagen 2010.)

Käänteiskopioijaentsyymin toimintaan perustuvan RT-PCR:n on havaittu olevan herkkä ja spesifinen menetelmä detektoitaessa näytteestä hengitysteitä infektoivia RNA-virusia (Templeton ym. 2004: 1564). RT-PCR-menetelmän etuina ovat tutkittavan materiaalin käsittelyn minimoinnista seuraava pienentynyt ristikontaminaatoriski sekä prosessin nopeus (Suominen ym. 2010: 167; Qiagen 2010).

3.2.2 Reaktion vaatimat reagenssit

RT-PCR:n toivotaan tuottavan kopioita tutkittavasta templaatista, ja jotta tämä tavoite saavutettaisiin, tutkimusta varten valmistettavaan reaktioseokseen on lisättävä reaktion onnistumisen kannalta välttämättömät reagenssit. Monistusreaktion kannalta merkittäviä komponentteja ovat muun muassa tutkittavalle kohteelle komplementaariset alukkeet sekä lähtömateriaalia monistava polymeraasientsyymi. Detektoinnin onnistumiseksi reaaliaikaisen RT-PCR:n reaktioseokseen on myös lisättävä havainnoitavan signaalin muodostavat, leimana toimivat molekyylit, jotka ovat työssämme liitettyinä templaatille komplementaarisiiin koettimiin. (Suominen ym. 2010: 153, 157, 168.)

Polymeraasiketjureaktion hyödyntäminen laboratorioanalytiikassa perustuu suurilta osin DNA-polymeraasientsyymin käyttöön ja käyttöominaisuuksiin (Suominen ym. 2010: 117). Polymeraasientsyymejä on saatavilla monenlaisia ja entsyymin valinta toteutettavaa analytiikkaa varten pohjautuu muun muassa valittavan entsyymin lämmönsietokykyyn. DNA-polymeraasit toimivat DNA-synteesin katalyytteinä ja niillä on kyky muokata nukleiinihappomolekyylejä esimerkiksi pilkkomalla niitä pienempiin osiin niin sanotun eksonukleaasiaktiivisuuden avulla. (Holland ym. 1991: 7276). Tässä opinnäytteessä hyödynsimme hyvin lämpöä kestävästä HotStarTaq DNA-polymeraasia, joka on kemiallisesti modifioitu, alun perin *Thermus aquaticus*-bakteerista eristetty ja *Escherichia coli*-

bakteerissa ilmennetty DNA-polymeraasi (Qiagen 2010). Taq-polymeraasilla ei ole oikolukuaktiivisuusominaisuutta, mikä suurentaa sen tekemän kopiointityön virhefrekvenssiä (Suominen ym. 2010: 118). Käytettäessä RT-PCR-menetelmää diagnostisissa sovellutuksissa polymeraasin tekemät virheet eivät useimmiten ole ongelma. Polymeraasin virheet tapahtuvat entsyymikohtaisella frekvenssillä ja vain ensimmäisessä syklissä sattunut virhe monistuu kaikkiin juosteisiin. (Suominen ym. 2010: 158.)

DNA-polymeraasin kopioiman alueen rajaavat lyhyet, noin 15–40 nukleotidin mittaiset alukkeet (engl. primer). Alukkeet on suunniteltu huolellisesti vastaamaan tutkittavan templaatin emäsjärjestystä sellaisilla genomien alueilla, joiden väliltä polymeraasientsyymien halutaan kopioivan. Alukkeet ovat synteettisiä yksijuosteisia DNA-molekyylejä. Ne kiinnittyvät tutkittavan cDNA-juosteen vastakkaisiin päihin, minkä jälkeen Taq-polymeraasi kykenee aloittamaan kopiointityön tutkittavan alueen keskustaa kohden. (Suominen ym. 2010: 154.)

Reaaliaikaiselle RT-PCR:lle ja tulosten seurannalle merkittävänä reagenssina reaktioseokseen lisätään koettimet (engl. probe). Koettimiin voidaan tarvittaessa liittää fluoresoivia leimoja tulosten detektointiin helpottamiseksi. (Suominen ym. 2010: 193.) Käyttämämme proximal quenching-menetelmä perustuu koettimen kanssa toimivan, niin sanotun vaimentimen (engl. quencher) toimintaan. Työmme RT-PCR-sovellutuksessa hyödynsimme TaqMan®-koettimia, jotka toimivat yllä mainitun menetelmän tavoin. Menetelmässä fluoresoiva leima on sitoutunut käytettävän koettimen 5'-päähen ja vaimennin 3'-päähen. Ennen polymerisaatiota fluorofori ja vaimennin pysyvät suhteellisen lähellä toisiaan, jolloin fluoroforin aiheuttama fluoresoiva signaali vaimentuu. HotStarTaq DNA-polymeraasi käyttää hyväkseen 5'-eksonukleaasiaktiivisuuttaan pilkkoessaan TaqMan®-koetinta. Tällöin koettimen vaimennin ja fluorofori vapautuvat sidoksistaan, mikä saa aikaan fluoresoivan signaalin vahvistumisen. (Cepheid 2011b.) Havaittavan signaalin voimakkuus korreloi polymeraasiketjureaktiossa tuotetun DNA:n määrään (Suominen ym. 2010: 167–168).

Deoksinukleotidit (dNTP) toimivat RT-PCR:n vaatimana rakennusmateriaalina: polymeraasientsyymi rakentaa PCR-tuotetta lisäämällä deoksinukleotideja yksitellen kasvavaan DNA-sekvenssiin. Reaktioon lisättävien deoksinukleotidien eri lajeja on optimaalisessa reaktiossa yhtä paljon ja kokonaisuudessaan ylimäärä suhteessa templaatin määrään

(Suominen ym. 2010: 156, 162).

Reaktioseokseen lisätään usein myös RNAasi-inhibiittoreita, joiden tarkoitus on estää mahdollisten reaktioon mukaan päässeiden RNAasien vaikutus reaktioon. Reaktioseoksessa on lisäksi oltava magnesiumia, joka mahdollistaa osaltaan kiinnittymisreaktion onnistumisen ja vaikuttaa lisäksi cDNA-nauhojen kahdentumislämpötilaan nostamalla kaksinauhaisen cDNA:n sulamislämpötilaa. Magnesium vaikuttaa lisäksi käytettävän polymeraasientsyymin tarkkuuteen ja aktiivisuuteen sekä saatavan tuotteen spesifisyyteen. Magnesiumionit muodostavat liukoisia, polymeraasientsyymin substraattina toimivia komplekseja deoksinukleotidien kanssa. (Bustin 2000: 172; Suominen ym. 2010: 162.)

3.2.3 Tulosten detektointi reaaliajassa

Monistusreaktiota ja sen kehitystä pystytään monitoroimaan reaaliajassa hyödyntämällä reaaliaikaista PCR-tekniikkaa (engl. real-time PCR). Käytettäessä menetelmää, jossa analyysin aikana kyetään samanaikaisesti sekä monistamaan spesifinen DNA että detektoidaan monistustuotteen syntyä, PCR-analytiikka helpottuu ja täyttää paremmin analytiikalle usein asetetut korkeat tehokkuusvaatimukset. (Higuchi – Dollinger – Walsh – Griffith 1992: 413.)

Reaaliaikaisessa PCR:ssä reaktioseokseen on lisättävä jokin detektoinnin mahdollistava komponentti. Yleisesti tähän tarkoitukseen käytetään erilaisia leimoja – käytännössä fluoresoivia merkkiaineita, jotka on liitetty osaksi reaktiossa käytettäviä muita reagensseja. Fluoresoivien merkkiaineiden käytön tavoitteena on saada aikaan fluoresenssisignaalin voimistuminen merkkiaineen sitoutuessa valmistuvaan templaatin vastinsäikeeseen eli PCR-tuotteeseen. (Suominen ym. 2010: 166–167.) Templaatin ja koettimen hybridisaation detektio tapahtuu yleisimmin värin muodostuksen, luminesenssi- tai fluoresenssireaktion kautta (Suominen ym. 2010: 196).

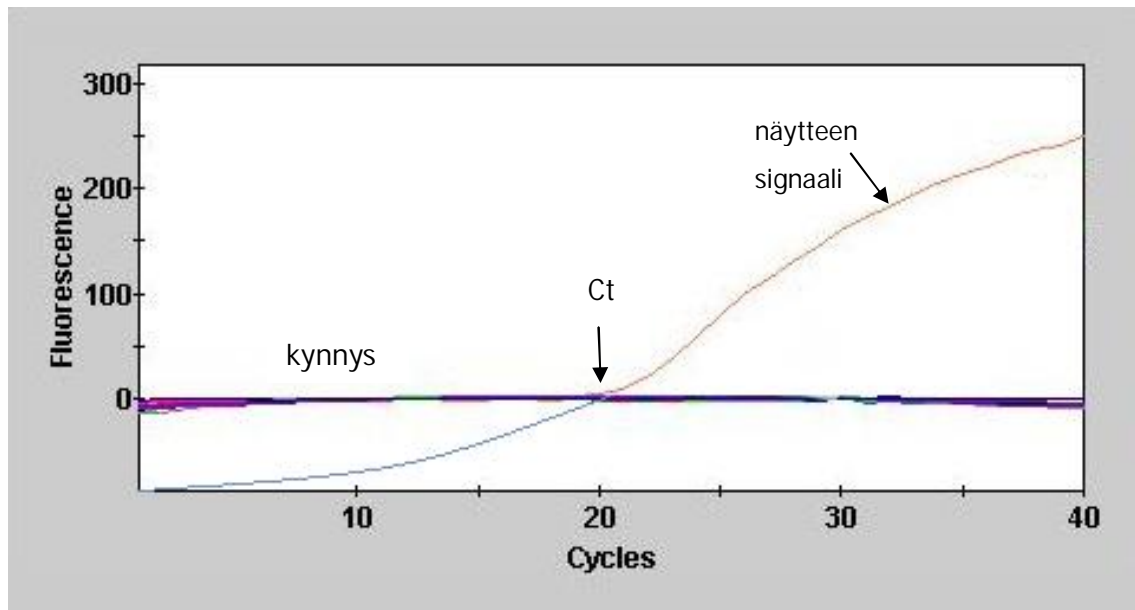
Fluoresoivan leiman valinta on merkittävä osa reaktion suunnittelua, sillä leiman detektoraja määrää analyysin herkkyuden. Ideaalinen leima on helppo kiinnittää DNA-molekyyliin, turvallinen käyttää, vakaa reaktioseoksen lämpötilan muutoksista huolimatta, helppo detektoida jo pieninä määrinä eikä häiritse käytettävän DNA-

polymeraasientsyymin toimintaa (Holland ym. 1991: 7279.) Opinnäytetyössämme hyödynnämme kolmea eri fluoresoivaa leimaa: Alexa Fluor®-, FAM™- ja TexasRed-leimoja, jotka on kiinnitetty TaqMan®-koettiin. Alexa Fluor®-leima on sitoutuneena influenssa B-virusta tunnistavan koettimen 5'-päähän ja FAM™-leima influenssa A-virusta tunnistavan koettimen 5'-päähän. TexasRed-leimattu koetin tunnistaa reaktiossa käytettävää sisäistä monistuskontrollia. Fluoroforeista saatavien spesifisten fluoresenssisignaalien avulla erotamme influenssatyypit toisistaan. (Cepheid 2009.)

Reaaliaikaisen PCR-menetelmän tuottama fluoresenssisignaali ilmoitetaan RFU-arvona (engl. relative fluorescence unit), joka on laitekohtainen fluoresenssiyksikkö. Näin ollen laitteiden ilmoittamissa tulossignaalien voimakkuuksissa voi olla merkittäviä eroja. Reaktion tuottamia tuloksia seurataan laitteiston piirtämän monistuskäyrän avulla, jolle sijoittuvista arvoista erityisesti kynnysyösklin arvo (engl. cycle threshold, CT) on diagnostisten tutkimusten kannalta olennainen. (Suominen ym. 2010: 167.)

Kynnysyösklin on se reaktion monistusyösklin, jonka aikana reaktiosta saatava tulossignaali ylittää kynnystason. Kynnystasolla tarkoitetaan sitä tasoa, jolla reaaliaikaisen PCR-tuotteen aiheuttama fluoresenssi kasvaa taustan aiheuttamaa fluoresenssia suuremmaksi. Tällöin tuotteen aiheuttama signaali on detektoitavissa (kuvio 2). (Applied Biosystems 2011.) Käytännössä kynnystason ylittyminen tarkoittaa diagnostisen tutkimuksen tuloksen osoittautumista positiiviseksi.

Kynnysyösklin (Ct) suuruus on verrannollinen alkuperäiseen templaattimäärään. Yhden Ct-arvon nousu tarkoittaa templaatin määrän kaksinkertaistumista suhteessa edelliseen näytteeseen. Tämä voidaan havaita muun muassa näytteestä tehdyillä laimennossarjoilla, joissa Ct-arvo nousee noin 3,3 yöskliä jokaisen kymmenkertaisen laimennoksen kautta. Mitä suurempi määrä templaattia reaktioseoksessa on, sitä pienempi on Ct-arvo ja sitä aikaisemmin monistettava tuote monistuu. (Hernes ym. 2011: 161; Bustin 2000: 179.)



Kuvio 2. Reaaliaikaisen PCR:n tulossignaali. Y-akselilla on fluoresenssisignaalin RFU-arvo ja x-akselilla on monistussyklien määrä. Kuviossa esiteltävän näytteen tuottama fluoresoiva signaali on detektoitavissa 20 monistussyklin kohdalla, jolloin näytteen Ct-arvo on 20.

3.2.4 Laadunvarmistus

Kontrollireaktioilla pyritään varmistamaan menetelmän laatu ja luotettavuus sekä työkentelytapojen oikeellisuus. Jokaiseen reaktioon on suunniteltava analytiikan luonnetta vastaava määrä kontrollireaktioita. Muun muassa kontaminaatioalttiuden takia PCR-reaktiossa käytetään steriiliä vettä, joka toimii sekä puhtaus- että negatiivisena kontrollina. Muita käytettäviä kontrolleja ovat tunnetut negatiiviset ja positiiviset näytteet sekä mahdolliset reaktiokohtaiset sisäiset kontrollit. (Suominen ym. 2010: 156.) Negatiivisen kontrollin avulla varmistetaan, ettei diagnostiikkaan käytettävästä reaktiosta saada vääriä positiivisia tuloksia.

Tutkimuksesta saatavat väärät negatiiviset tulokset voivat olla seurausta DNA-polymeraasin inhibitiosta. Tämän ilmiön esiintyminen voidaan detektoida jokaiseen reaktioon lisättävän sisäisen monistuskontrollin avulla. Kontrolli on suunniteltu siten, että se monistuu monistumisreaktion mahdollistavassa reaktioseoksessa, mutta vasta suuren syklimäärän jälkeen, jolloin sen aiheuttama fluoresenssi ei aiheuta häiriötä tutkittavaa kohdetta detektoitaessa. Niinpä sekä sisäisen monistuskontrollin toimimatto-

muus, että myöhään havaittava tutkittavan kohteen signaali viestivät reaktion mahdollisesta inhibitiosta. (Higuchi ym. 1992: 416.) Sisäisen monistuskontrollin käyttö jokaisessa reaktiossa varmistaa suorituksen laadun ja siten menetelmän sopivuuden diagnostiseen käyttöön (Templeton ym. 2004: 1567).

PCR-menetelmän herkkyys luo haasteita myös sitä toistamaan suunniteltujen laitteiden tarkkuuden ja toistettavuuden arvioinnille sekä näiden ylläpitämiselle. Laitteiston kuntoa ja toiminnan oikeellisuutta on ylläpidettävä säännöllisin toimenpitein. Polymeeraasiketjureaktion perustuessa tarkkoihin lämpötilavaihteluihin jo muutaman asteen muutokset voivat saada aikaan tulosten virheellisyyden. Erityisesti laitteen kalibroinnissa, kontrolloinnissa ja huollossa on kiinnitettävä huomiota estottomaan lämmönsiirtoon ja analysoinnin yhteydessä reaktioseosten tilavuudet on pidettävä mahdollisimman pieninä. (Suominen ym. 2010: 164.)

Optimoinnilla tavoitellaan muun muassa menetelmän optimaalista spesifisyyttä, herkkyyttä, toistettavuutta ja tarkkuutta (Bustin 2000: 170). Polymeeraasiketjureaktiossa tarvittavien komponenttien pitoisuudet sekä tutkimuksen aikana vallitsevat olosuhteet on säädettävä optimaaliseksi reaktiolle asetettujen tavoitteiden ja riittävän tehokkuuden saavuttamiseksi (Suominen ym. 2010: 154). Kaikki PCR:ssä käytettävät komponentit ovat toisistaan riippuvaisia (Bustin 2000: 170) ja siksi niiden määrät ja määrasuhteet suunnitellaan tarkasti ennen reaktion toteuttamista (Suominen ym. 2010: 162).

Herkkyydestään johtuen polymeeraasiketjureaktio on kontaminaatioaltis menetelmä. Erityisen suuri kontaminaation riski on silloin, kun monistettavaa nukleinihappoa on tutkittavissa näytteissä hyvin pieniä määriä. Toisaalta hyödynnettäessä PCR-menetelmiä diagnostiikassa, jolloin laitteita käytetään toistuvasti, kontaminaatiovaaran todennäköisyys suurenee. Tällöin kyseeseen tulevat esimerkiksi reagensseista ja edellisistä reaktioista peräisin olevien tuotteiden aiheuttama kontaminaatio. Reaktiossa kontaminoiva nukleinihappomolekyyli voi monistua epätarkoituksenmukaisesti templaatin sijaan. Tästä seurauksena tutkittava templaatti ei ehkä monistu lainkaan kontaminoivan ja tutkittavan DNA:n kilpaillessa polymeeraasientsyymistä. (Suominen ym. 2010: 165.)

Kemikaalilain edellyttämä hyvä laboratoriokäytäntö (engl. good laboratory practise, GLP) ohjaa laboratorion henkilöstön työtapoja (Jaarinen – Niiranen 2005: 9; Suominen ym. 2010: 165). Erityisen tärkeää työtapojen kontrollointi on herkkiä PCR-menetelmiä optimoitaessa ja reaktioita toteutettaessa. PCR:n reaktioseoksen valmistamiseen eli mastermixin eri komponenttien sekoittamiseen sekä tutkittavan kohteen monistamiseen on hyvä varata vain tähän käyttöön tarkoitettut, eristetyt, ylipaineistettut ja kululta rajatut tilansa. Myös PCR-huoneiden ilma on hyvä suodattaa, sillä monistettu nukleiinihappo voi kantautua paikasta toiseen huoneilman partikkelien kuljettamana. (Suominen ym. 2010: 165.)

Reaktioseoksen valmistaminen puhtaassa laminaarivirtauskaapissa on yksi yleisesti käytössä olevista tavoista alentaa kontaminaatoriskiä. Pipetoinnissa on syytä käyttää suodattimen sisältäviä pipetinkärkiä, jolloin vältetään reaktion komponenttien sekoittuminen aerosolimuodostuksen takia, pipetoitaessa liuoksia eri reaktioputkiin. PCR-työskentelyn aikana käytetään suojakäsineitä, joiden on oltava puuterittomia. Suoja-vaatteet ovat huonekohtaisia ja ne päällä ei saa siirtyä varsinkaan reaktioseoksen valmistamiseen käytettyyn huoneeseen monistushuoneessa työskentelyn jälkeen. Reaktioputki on pidettävä suljettuna aina kun mahdollista ja sen saa avata vasta, kun korkiin tiivistynyt reaktioseos on sentrifugoitu putken pohjalle. (Suominen ym. 2010: 166.)

3.3 Actim® Influenza A&B-antigeeniosoitus

Medix Biochemican valmistama Actim® Influenza A&B-vieritestit on helppokäyttöinen ja nopea testi, joka tunnistaa ja erottelee influenssa A- ja B-virusten antigeenit hengitystienäytteistä. Testin on osoitettu tunnistavan myös influenssa A-viruksen alatyypit H1N1v, H5N3, H7N3, H9N2 ja H5N1, joiden erotteluun testi ei kuitenkaan sovellu. Testin ei ole osoitettu ristireagoivan suhteessa muihin hengitystieviruksiin tai bakteereihin. (Medix Biochemica.)

3.3.1 Testin periaate

Actim® Influenza A&B-vieritestin toiminnan perustana on immunokromatografinen menetelmä. Testiliuskassa on monoklonaalisia vasta-aineita, jotka tunnistavat näytteessä olevien influenssavirusten antigeeneja: influenssa A- ja B-virusten nukleoproteiineja. Tulos voidaan havaita testiliuskaan ilmestyvien viivojen avulla. Testi on kvalita-

tiivinen, joten sitä voidaan käyttää ainoastaan influenssavirusten osoittamiseen, ei virusmäärän mittaamiseen. (Medix Biochemica.)

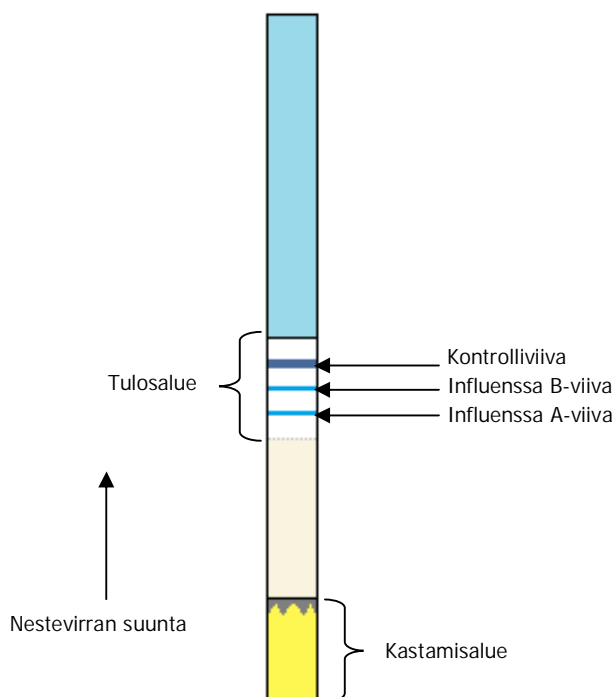
3.3.2 Testin suoritus

Actim® Influenza A&B-vieritestin reagenssipakkaus sisältää kaikki tarvittavat välineet testin suorittamiseen eikä suorittaminen vaadi erillisiä laitteita. Näytemateriaaliksi sopivat erilaiset hengitystienäytteet, kuten nasaaliaspiraatti, nasaalihuuhde, vanutikkunäyte nenästä tai nenänielusta sekä kuljetusnesteeseen kerätyt näytteet. (Medix Biochemica.)

Reagenssipakkauksen sisältämä uuttopuskuri lisätään näyteputkeen ja putken sisältö sekoitetaan hyvin. Mikäli näyte otetaan vanutikkunäytteenä, putkeen lisätään pieni määrä natriumkloridiliuosta. Näyte otetaan potilaan hengitysteistä, asetetaan näyteputkeen ja sekoitetaan puskuriin noin kymmenen sekunnin ajan. Tämän jälkeen näytteen annetaan liueta puskuriin noin viisi minuuttia. Tämän jälkeen testiliuskan keltainen osa kastetaan näyte-puskuriliuokseen ja odotetaan kunnes neste saavuttaa tulosalueen. Liуска poistetaan näyteputkesta, asetetaan vaakasuoraan asentoon noin kymmeneksi minuutiksi, minkä jälkeen tulos luetaan valmistajan ohjeiden mukaisesti. (Medix Biochemica.)

3.3.3 Testin tulosten lukeminen

Vieritestin tulos luetaan testiliuskaan ilmestyvien viivojen avulla (katso kuvio 3). Sininen viiva tulosalueen alaosassa osoittaa positiivisen influenssa A-tuloksen ja sininen viiva tulosalueen keskiosassa osoittaa positiivisen influenssa B-tuloksen. Mikäli tulosalueella on nähtävissä kaksi sinistä viivaa, on näyte sekä influenssa A- että B-positiivinen. Negatiivisen testituloksen yhteydessä tulosalueella näkyy vain yksi musta kontrolliviiva. Jotta testitulos olisi luotettava, tulisi mustan kontrolliviivan ilmestyä tulosalueelle jokaisessa testissä. Jos kontrolliviiva ei ilmesty, ei tulosta voi tulkita. Tällaisessa tilanteessa testi on uusittava toisella liuskalla. (Medix Biochemica.)



Kuvio 3. Actim Influenza A&B-vieritestiliuskan toimintaperiaate ja rakenne. (Mukaillen: Medix Biochemica.)

4 Menetelmävalidointi

Menetelmävalidointi on korkeatasoisten laboratorioiden laadunhallinnan työkalu ja tärkeä toimenpide tulosten luotettavuuden varmistamiseksi (Ehder 2005: 25; Jaarinen – Niiranen 2005: 11). Sen avulla pyritään osoittamaan uuden menetelmän toimivuus, kelpoisuus ja luotettavuus sekä täsmentämään uuden menetelmän käyttötarkoitus (Linko 2003: 26; Jaarinen – Niiranen 2005: 11; Ehder 2005: 25; Eurachem 1998: 4). Erityisesti kliinisissä laboratorioissa oikean tuloksen määrittäminen on tärkeää potilaan hoidon kannalta ja laboratorion on pystyttävä osoittamaan tuottamiensa tulosten oikeellisuus (Eurachem 1998: 4; Jaarinen – Niiranen 2005: 8).

Menetelmävalidointi on suoritettava, kun uusi menetelmä kehitetään tai käytössä olevaa menetelmää halutaan parantaa, uudistaa tai sen käyttötarkoitusta laajennetaan. Tämä lisäksi validoinnilla voidaan osoittaa kahden eri mittausmenetelmän antamien tulosten yhteneväisyys. (Ehder 2005: 28; Eurachem 1998: 6.) Validointi voidaan suorit-

taa joko vertaamalla uutta menetelmää käytössä olevaan tai eri laboratorioiden välisenä vertailututkimuksena (NordVal 2009: 4). Uudet tulokset ovat menetelmän hyödynnettävyyttä ajatellen joko yhtä hyviä tai parempia kuin referenssimenetelmällä saadut tulokset.

Validoinnissa pyritään toimimaan todellisuutta vastaavalla tavalla, eli validointiin sisältyvät määritykset tehdään mahdollisimman hyvin todellista näytemateriaalia vastaavista näytteistä. Tämän lisäksi validoinnin on oltava riittävän kattava sekä tutkittavien näytteiden määrän että näytemateriaalin monipuolisuuden suhteen. Riittävällä näytemäärällä voidaan sulkea pois erilaisia mittausepävarmuuksiin liittyviä tekijöitä. Menetelmävalidoinnissa määritetään samalla näytemateriaalia koskevat vaatimukset, koska edes hyvä ja toimiva menetelmä ei pysty tuottamaan luotettavaa tulosta huonolaatuisesta näytteestä (Eurachem 1998: 5). Validointityötä ohjaa standardi SFS-EN ISO 15189: 2007, jossa määritellään erityisvaatimuksia laadukkaalle klinisen laboratorion toiminnalle. Standardi sisältää määräyksiä, joiden mukaan laboratorioiden on validoitava menetelmänsä ja siten varmistettava tutkimusmenetelmien sopivuus käyttötarkoitukseensa. (Linko 2003: 24.)

Laboratorioiden tulee käyttää suorittamiinsa lääketieteellisiin tutkimuksiin vain validoituja menetelmiä (Ehder 2005: 55). Validointivaatimus koskee menetelmiä, joita ei ole standardisoitu, sekä menetelmiä, jotka ovat laboratorion itsensä kehittämiä. Jo standardisoidut menetelmät on validoitava yllä mainitun ISO-standardin mukaan uudelleen, jos kyseisiin menetelmiin tehdään lisäyksiä tai muutoksia. Terveysalan laboratorioissa merkityksellistä on myös varmistaa, että validoitavan menetelmän tulosten mittausalue ja tarkkuus määritetään asianmukaisiksi asiakkaan tarpeisiin nähden. (FINAS – akkreditointipalvelu 2011: 3; Ehder 2005: 55.) Menetelmää käyttävä laboratorio on itse vastuussa menetelmän asianmukaisesta validoinnista ja päättää itse validoitavista parametreista. Validoinnin laajuus riippuu menetelmän käyttötarkoituksesta sekä luonteesta kvalitatiivisena tai kvantitatiivisena menetelmänä. (Eurachem 1998: 6.)

Uuden menetelmän validointi on työläs ja tarkka prosessi, joka tulisi suorittaa tiettyjen standardien mukaisesti laatukriteerejä tarkasti noudattaen. Validoinnin vaiheet ja mitaustulokset tulisi aina dokumentoida validointiraporttiin seurantaa varten. Prosessi voidaan jakaa seuraaviin vaiheisiin (Jaarinen – Niiranen 2005: 30):

1. Koejärjestelyn suunnittelu
2. Mittausten suorittaminen
3. Tulosten arviointi
4. Tulosten laskeminen
5. Menetelmäohjeiden laatiminen
6. Laadunvalvonnan ohjeiden laatiminen

Validoinnin kohteena olevan menetelmän valinnassa on huomioitava analyysille asetetut vaatimukset, kuten määritettävien analyyttien pitoisuudet, tulosten tarkkuus, menetelmän soveltuvuus eri materiaaleille sekä nopeus ja hinta. (Jaarinen – Niiranen 2005: 30–31.) Tämän lisäksi menetelmän kliininen käyttötarkoitus, ympäristövaikutukset, kustannustehokkuus sekä työsuojelulliset asiat vaikuttavat lopulliseen päätökseen, kun arvioidaan validoitavan menetelmän rutiinitutkimuksiin käyttöönoton ajankohtaa (Ehder 2005: 55).

4.1 Validoinnin raportointi

Validoinnin suorittamisen ja hyväksymisen jälkeen tulisi prosessi dokumentoida, jotta menetelmän käyttö olisi jatkossa yksiselitteinen. Validoinnin arvioinnissa oletetaan, että menetelmää käytetään yhdenmukaisesti jokaisella analyysikerralla: menetelmän tarkkuus ei vastaa validoinnin tuloksena saatua tarkkuutta, jos menetelmää ei käytetä validoinnissa määritetyllä tavalla. Tämän takia validoinnin raportointi on oleellinen osa validointiprosessia ja raportin avulla voidaan varmistaa, että menetelmää käytetään johdonmukaisesti kerrasta toiseen. (Eurachem 1998: 37.)

Validointiraportista tulisi käydä ilmi työn tavoite, toteutus, mittauksiin käytetyt laitteistot, välineistö, tutkittu materiaali sekä määritetyt parametrit, kuten esimerkiksi menetelmän herkkyys ja toteamisraja. Raporttiin kirjataan validointisuunnitelman mukaiset toimenpiteet, tulokset ja määritetyt spesifikaatiot. Raportin yhteenvedossa todetaan, täyttääkö menetelmä sille asetetut vaatimukset ja soveltuuko se aiottuun käyttötarkoitukseen. (Ehder 2005: 26, 38.)

4.2 Validoinnissa määritettävät parametrit

Uuden menetelmän suorituskky arvioidaan validoinnissa suunniteltujen mittaussarjojen avulla (Jaarinen – Niiranen 2005: 11). Suorituskvyn arviointi tapahtuu menetelmän luonteen perusteella valittujen parametrien avulla. Kvalitatiivisiin ja kvantitatiivisiin menetelmiin liittyvät parametrit määritetään eri tavoin ja lisäksi validoitavan menetelmän tuleva käyttötarkoitus ohjaa osittain mitattavien parametrien valintaa (NordVal 2009: 4).

Kvalitatiivisen menetelmän validoinnissa määritettäviä parametrejä ovat esimerkiksi menetelmän selektiivisyys, spesifisyys, toistettavuus, uusittavuus sekä herkkyys (Ehder 2005: 25–26; NordVal 2009: 4). Tämän lisäksi kvalitatiivisessa menetelmää validoitaessa pyritään tunnistamaan näytteenottoon liittyvä mittausepävarmuustekijät sekä jäljittämään fysikaalisten suureiden vaikutus tuloksiin (Ehder 2005: 55).

Selektiivisyys (valikoivuus) kertoo, miten tarkasti menetelmä pystyy erottamaan tutkitavan analyytin näytteessä mahdollisten muiden komponenttien läsnäolosta huolimatta (Jaarinen – Niiranen 2005: 11; Ehder 2005: 27). Täysin selektiivinen menetelmä pystyy spesifisesti osoittamaan tutkitavan analyytin olemassaolon ilman muiden yhdisteiden aiheuttamaa häiriötä (Jaarinen – Niiranen 2005: 11). Selektiivisyyttä voidaan tutkia lisäämällä näytteisiin tiettyjä häiritseviä tekijöitä, joita voidaan olettaa esiintyvän näyttemateriaalissa normaalioloissa (Eurachem 1998: 15). Myös menetelmän spesifisyys (täsmällisyys) kertoo menetelmän kyvystä mitata vain haluttua analyyttiä ja voidaan diagnostisessa kokeessa kuvata todennäköisyydellä, jolla terve henkilö todetaan terveeksi (Duodecim 2011). Spesifinen menetelmä on täysin selektiivinen tutkittavalle analyytille, mutta vain harvat menetelmät täyttävät tämän kriteerin. (Ehder 2005: 27.)

Määrittämällä toistettavuus pystytään ilmaisemaan kaikissa mittauksissa satunnaisesti vaikuttavan satunnaisvirheen suuruus. Satunnaisvirhe vaikuttaa joko tulosta pienentäen tai suurentaen (Ehder 2005: 37; Jaarinen – Niiranen 2005: 32). Menetelmän toistettavuus voidaan määrittää suorittamalla rinnakkaisia tutkimuksia näytteistä, joissa on eri pitoisuudet tutkittavaa analyyttiä. Saaduista tuloksista lasketaan tulosten välinen vaihtelu eli hajonta mittaussarjojen sisällä sekä eri mittaussarjojen välillä. Yleensä mittaussarjojen sisäinen vaihtelu on pienempi kuin näytesarjojen välinen vaihtelu. (Jaarinen –

Niiranen 2005: 12, 30.) Keskihajonta (SD) voidaan laskea seuraavan kaavan avulla (kaava 1):

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - x)^2}{n - 1}}$$

x_i = yksittäinen Ct-arvo
 x = toistomittausten Ct-arvojen keskiarvo
 n = toistomittausten lukumäärä

Kaava 1. Keskihajonnan laskeminen.

Mikäli sarjojen välinen hajonta on merkittävästi suurempi kuin sarjojen sisäinen hajonta, sarjojen välillä sanotaan esiintyvän todellista vaihtelua. Syy vaihteluun tulisi selvittää. Toistomittaukset on syytä suorittaa samoissa olosuhteissa lyhyellä aikavälillä, jotta ne olisivat vertailukelpoisia. Toistojen määrän tulisi tulla esiin validointiraportissa, jossa arvioidaan tulosten tilastollista luotettavuutta. (Ehder 2005: 37.)

Keskihajonnan lisäksi voidaan menetelmän toistettavuus osoittaa laskemalla tulosten variaatiokerroin (CV %). Variaatiokerroin saadaan suhteuttamalla keskihajonta keskiarvoon ja kertomalla tulos sadalla (kaava 2):

$$CV \% = \frac{SD}{x} * 100$$

SD = keskihajonta
 x = toistomittausten Ct-arvojen keskiarvo

Kaava 2. Variaatiokertoimen laskeminen.

Uusittavuus kuvastaa, miten samoista näytteistä ja samalla menetelmällä tehdyt mittaukset korreloivat keskenään, kun ne suoritetaan muuntuneissa olosuhteissa, esimerkiksi eri laboratorioissa. Laboratorioiden välisillä vertailumittauksilla voidaan tarkastaa menetelmien toistettavuus ja uusittavuus laboratorioiden välillä sekä todeta menetelmien systemaattisia virheitä. Tämän tyyppiset vertailumittaukset ovat tarpeen uuden menetelmän validoinnin yhteydessä tai kun halutaan arvioida käytössä olevan menetelmän suorituskykyä. Vertailuissa kaksi tai useampia laboratorioita tutkii samoja näytteitä ja arvioi sitten näytteistä saatuja tuloksia keskenään. (Ehder 2005: 37, 45–46.)

Menetelmän herkkyys voidaan määrittää vertaamalla validoitavan menetelmän tuloksia referenssimenetelmän tuloksiin. Herkkyys kuvastaa kyseisen menetelmän kykyä osoittaa näytteestä tutkittava tekijä, esimerkiksi influenssaviruksen RNA näytteessä mahdollisesti mukana olevien, häiritsevien tekijöiden läsnäolosta huolimatta. Menetelmän herkkyys (sensitiivisyys) kuvastaa diagnostisessa kokeessa saatujen oikeiden positiivisten tulosten osuutta kaikista sairaista tutkittavista, eli todennäköisyyttä, jolla sairas todetaan sairaaksi (Duodecim 2011).

Osana validointiprosessia varmistetaan lisäksi vertailumateriaalin avulla, että menetelmä on toistettavuuden suhteen käyttötarkoitukseensa soveltuva. Mitä enemmän toistoja tehdään, sitä luotettavampana tuloksista tehtyjä tulkintoja voidaan pitää (Jaarinen – Niiranen 2005: 30–31).

5 Tutkimusasetelma

Opinnäytetyömme sisältää influenssa A- ja B-virusten nukleinihappoa osoittavan SmartCycler® RT-PCR-menetelmän validoinnin osan sekä vertailun validoitavalla menetelmällä ja Actim® Influenza A&B-vieritestillä saatujen tulosten välillä. Toimeksiantajamme aloitteesta suoritimme menetelmävalidoinnin tutkimusosion, jossa hyödynsimme referenssimateriaalina PCR-menetelmällä Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitoksen testattuja, influenssaviruksia sisältäviä näytteitä. Menetelmävertailu käsittää Medix Biochemican valmistaman Actim® Influenza A&B-vieritestin suorittamisen yhteydessä kerättyjen näytteiden soveltuvuuden arvioinnin toimeksiantajamme käyttämän reaaliaikaisen SmartCycler® RT-PCR-menetelmän näytemateriaaliksi. Menetelmävalidointi- ja -vertailuosiot toteutettiin rinnakkain yhteensä kahdeksassa PCR-ajossa: vertasimme validoinnin kohteena olevalla RT-PCR-menetelmällä saatuja tuloksia vieritestillä saatuihin tuloksiin ja samalla RT-PCR-sarjat suunniteltiin tuottamaan informaatiota SmartCycler® RT-PCR-menetelmän oikeellisuudesta, kun sarjoihin sisällytettiin THL:n PCR-menetelmällä tutkittavia näytteitä.

Toimeksiantajamme arvioi hyödyntämämme näytemateriaalin olevan SmartCycler® RT-PCR-menetelmän validointiin sopiva ja riittävästi informaatiota tuottava. Tutki-

mamme menetelmä tulee rutiinikäytössä tuottamaan influenssadiagnostiikan tueksi kvalitatiivisia tuloksia, eli käytännössä tiedon, ovatko menetelmällä tutkitut näytteet negatiivisia vai positiivisia influenssa A- ja B-virusten suhteen. Määritimme tutkimuksemme avulla validoitavan menetelmän kvalitatiivisen herkkyys- ja spesifisyytason, toistettavuuden, uusittavuuden, oikeellisuuden ja lineaarisuuden. Näiden parametrien kautta tehtiin validoinnin päätteeksi arvio menetelmän soveltuvuudesta toimeksiantajamme määrittelemään rutiinikäyttöön influenssadiagnostiikassa. Tutkimamme SmartCycler® RT-PCR-menetelmän kvalitatiivisen luonteen vuoksi menetelmän spesifisyyteen ja herkkyyteen liittyvä informaatio käsiteltiin ristiintaulukoinnin avulla.

Tutkimuskohteenamme olevan reaaliaikaisen SmartCycler® RT-PCR-menetelmän toimeksiantajamme oli valinnut validoitavaksi ja myöhemmin rutiinikäyttöön otettavaksi siksi, että kyseinen menetelmä mahdollistaa vieritestien tulosten oikeellisuuden varmistamisen nopeasti ja luotettavasti. Validoidun menetelmän on siis tarkoitus tulevaisuudessa toimia Actim® Influenza A&B-vieritestin referenssinä. Tällainen vertailumenettely tulee kyseeseen silloin, kun herkkyydeltään reaaliaikaista RT-PCR-menetelmää heikommaksi todetun vieritestin tulos osoittautuu negatiiviseksi, mutta asiakas tai klinikko haluaa varmistua vieritestin tuloksen oikeellisuudesta. Lisäksi SmartCycler® RT-PCR-menetelmällä kyetään osoittamaan influenssaviruksen nukleiinihappo tutkittavista näytteistä nopeasti. Menetelmän korkea herkkyys ja nopeus parantavat influenssavirusinfektioon sairastuneen potilaan hoidon sujuvuutta sekä oikeellisuutta, kun influenssatapaukset kyetään osoittamaan luotettavasti lyhyiden vastausviiveiden puitteissa.

5.1 Aikaisemmat tutkimukset

Ghebremedhinin johtama saksalainen tutkimusryhmä julkaisi vuonna 2009 artikkelin, jossa arvioidaan Actim® Influenza A&B-vieritestin toimivuutta kvalitatiivisessa influenssaosoituksessa. Tutkimuksen näytemateriaalina käytettiin erilaisia hengitystienäytteitä (n=473), joista suurin osa (461 kpl) oli kerätty lapsipotilailta, joilla ilmeni influenssan kaltaisia oireita. Vieritestin suorituskykyä verrattiin jo käytössä olevaan ”in-house” RT-PCR-menetelmään herkkyyden, spesifisyyden ja testin vaatiman suoritusajan suhteen ja lisäksi tutkimuksen osana tehtiin ristireaktiotesti. Influenza A&B-vieritestauksesta saadut tutkimustulokset osoittivat influenssa A-virusmateriaalia yhdeksässä näytteessä ja influenssa B-virusmateriaalia kuudessa näytteessä. Vastaavat tulokset RT-PCR menetelmällä olivat 13 positiivista influenssa A-tulosta ja 10 positiivista influenssa B-tulosta.

Actim® Influenza A&B-vieritestin spesifisyyden todettiin olevan 100 % ja testin herkkyyden 65 % verrattuna RT-PCR-referenssimenetelmällä saatuihin tuloksiin. Ristireaktiotestin perusteella Actim® Influenza A&B-testin todettiin olevan spesifinen influenssavirusten antigeenien osoittaja. Yhteenvetona tutkimuksesta Ghebremedhin ym. totesivat tutkimansa vieritestin olevan soveltuva positiivisten influenssatulosten osoittamiseen korkean spesifisyyden takia, mutta negatiivisiksi jääneitä tuloksia tulisi tutkia tutkimusryhmän mukaan herkemällä menetelmällä ennen lopullisen diagnoosin määrittämistä. (Ghebremedhin ym. 2009: 365–369.)

Toinenkin tutkimus koskien Actim® Influenza A&B-vieritestin herkkyyttä ja spesifisyyttä on julkaistu samana vuonna edellä mainitun Ghebremedhinin ym. tutkimuksen kanssa. Kyseisessä tutkimuksessa Steininger ym. arvioi ja vertaa neljän eri vieritestin tuloksia RT-PCR-menetelmällä saatuihin tuloksiin. Tutkimuksessa Actim® Influenza A&B-vieritestin herkkyys influenssa A-viruksen (alatyypin H3N2) tunnistamisessa on vain 40 %, joka on kuitenkin paras tulos verrattaessa Actim® Influenza A&B-testillä saatuja tuloksia muiden tutkimuksessa tarkasteltujen vieritestien vastaaviin tuloksiin. Kyseisessä tutkimuksessa vieritestausta ei suoritettu valmistajan suositusten mukaisesti: testattavat näytteet laimennettiin ensin ja pakastettiin sitten -70 °C asteessa. Sulatusvaiheella on ehkä yhteys tutkimuksesta saatuun matalaan herkkyyteen, sillä viruksen pintaantigeenien rakenteet saattavat muuttua pakastus-sulatussyklin johdosta. Lisäksi tutkijat osoittivat tutkimuskohteenaan olevan vieritestin herkkyytason laskevan merkittävästi potilaan iän kasvaessa. Tässä on huomioitava influenssavirukselle ominainen ilmenemisen runsaus lapsipotilailla verrattuna aikuisiin. Kyseessä ei siis ole vieritestin ominaisuuksista johtuva herkkyytason lasku. Kuten edellisessäkin tutkimuksessa, Steininger ym. suosittelevat negatiivisiksi jääneiden tulosten varmistamiseksi lisätutkimusta herkemällä menetelmällä väärin negatiivisten tulosten poissulkemiseksi. (Steininger ym. 2009: 267–272.)

Lisäksi suomalainen tutkimusryhmä on julkaisut artikkelin, jossa Actim® Influenza A&B-vieritestin tuloksia verrataan muun muassa PCR-menetelmään. Tutkimus on kaksisainen ja menetelmävertailun lisäksi siinä tutkitaan mahdollisuutta diagnosoida influenssatartunta 24 tunnin sisällä oireiden alkamisesta 1-3-vuotiailla lapsilla. Tuloksissa Actim® Influenza A&B-vieritestin herkkyys influenssa B-viruksen osoituksessa oli vain 25 %, joka on tiedonhaussa löytämistämme tuloksista heikoin. Influenssa A-viruksen

suhteen vieritestit antoi jopa 90 % herkkyystason. Influenssa B-virusten osoittamisessa arvo jäi huomattavasti matalammaksi. (Heinonen – Silvennoinen – Lehtinen – Vainiopää – Heikkinen 2011: 387–391.)

Edellä mainittujen tutkimustulosten perusteella ja tutkimuksia verrattaessa voidaan todeta Actim® Influenza A&B-vieritestin olevan herkkyystasoltaan epävaka. Kyseinen vieritesti ei ole yhtä luotettava kuin hyvin herkäksi todettu PCR-menetelmä. On siis syytä suhtautua vieritestillä saataviin negatiivisiin tuloksiin varauksella ja pyrkiä varmistamaan tulos herkemällä menetelmällä.

Loensin johtama tutkimusryhmä arvioi tutkimuksessaan NucliSens® easyMAG®-laitteen suorituskykyä ja käyttömukavuutta erilaisten kliinisten näytteiden eristämisessä. Referenssinä tuloksia vertailtiin QIAGENin manuaaliseen eristystuotepakkaukseen ja NucliSens miniMAGiin. Eristettyjen nielunäytteiden kohdalla pystyttiin monistuksen jälkeen toteamaan matalampia Ct-arvoja NucliSens® easyMAG-laitteella eristettyjen näytteiden osalta verrattuna QIAGEN-eristykseen. Yksi easyMAG-laitteella eristetty näyte osoittautui monistuksen jälkeen negatiiviseksi, vaikka toinen eristysmenetelmä antoi näytteestä positiivisen tuloksen. Tämän poikkeavan tuloksen ei kuitenkaan todettu olevan tilastollisesti merkittävä. (Loens ym. 2007: 422–424.)

Myös Loensin tutkimuksessa eristetyistä CMV-positiivisista kokoverinäytteistä easyMAG® antoi QIAGEN-menetelmällä saatuja tuloksia matalammat Ct-arvot. EasyMAGilla eristettyjen näytteiden monistuksessa saadut matalammat Ct-arvot voivat johtua suuremmasta DNA-määrästä, puhtaammasta lähtömateriaalista tai inhibiittoreiden puutteesta. Tulokset osoittavat, että easyMAGilla eristetty nukleinihappo on korkealaatuisempaa, kuin QIAGENin manuaalisella käsittelyllä eristetyt nukleinihapot. Korkealaatuisemmalla eristeellä tarkoitetaan tässä yhteydessä eristystuotteen puhtaustasoa sekä inhibiittoreiden puutetta. (Loens ym. 2007: 422–424.)

Hengitystieinfektioita aiheuttavia patogeeneja voidaan diagnosoida nopeasti ja luotettavasti niin sanotun multiplex RT-PCR-tekniikan avulla. Tämä tekniikka kehitettiin vuonna 2004, jolloin Templeton jne. suunnittelivat kaksi eri viruksia tai virustyyppiä samanaikaisesti erottelevaa ja detektoivaa menetelmää. Toisella heidän suunnittelemis-

taan reaktioista kyettiin detektoimaan influenssa A-, influenssa B- sekä HRSV (engl. human respiratory syncytial virus) -viruksia ja reaktiossa hyödynnettiin Texas Red™-, FAM- sekä HEX-leimoja. Tutkijat havaitsivat, että herkkyudet vastasivat toisiaan multiplex-menetelmän ja yksittäisten osoitusten välillä. Myöhemmin, vuonna 2005 Hindiyeh jne. kehittivät menetelmän, jolla voitiin detektoida samanaikaisesti influenssa A- influenssa B-, H7N7- ja H9N2-viruksia. (Mackay 2007: 190–191.)

5.2 Työtä ohjaavat kysymykset

Opinnäytetyöprosessimme käynnistyi toimeksiantajamme tavoitteesta validoida SmartCycler® RT-PCR-menetelmä diagnostiseen käyttöön Actim® Influenza A&B-vieritestin referenssimenetelmäksi. Rakensimme tämän tavoitteen pohjalta mahdollisimman kohdennetusti työn tarkoitusta ja tavoitteita vastaavat, prosessia ohjaavat tutkimuskysymykset. Opinnäytetyömme kautta pyrimme antamaan vastaukset seuraaviin kysymyksiin:

1. Miten hyvin validoitavalla SmartCycler® RT-PCR-menetelmällä saadut tulokset korreloivat referenssilaboratoriossa saatuihin tuloksiin?
2. Mikä on validoitavan SmartCycler® RT-PCR-menetelmän luotettavuustaso osoitettaessa ja eroteltaessa influenssa A- ja influenssa B-virusten nukleinihapporakenteita?
3. Mikä on Actim® Influenza A&B-vieritestin herkkyys- ja spesifisyystaso verrattaessa vieritestillä saatuja tuloksia SmartCycler® RT-PCR-menetelmällä saatuihin tuloksiin?
4. Kuinka yhdenmukaisia Actim® Influenza A&B-vieritestin immunokromatografiin perustuvalla menetelmällä ja sen referenssinä käytetyllä SmartCycler® RT-PCR-menetelmällä saadut tulokset ovat keskenään?

6 Opinnäytteen suoritus

Opinnäytetyömme kohdemenetelmä, SmartCycler® RT-PCR, on luonteeltaan kvalitatiivinen, toisin sanoen sillä tuotetut tulokset ovat laadullisia. Käytännössä tulokset tulkitaan siis joko positiivisiksi tai negatiivisiksi. Tutkimamme menetelmä voidaan tarvittaessa muokata kvantitatiiviseksi ajosarjoihin lisättävien standardiliuosten avulla. (Ehder 2005: 55.)

Tarkentaaksemme opinnäytetyömme rajausta haluamme korostaa, että opinnäytetyömme käsittää vain osan validoinnin ja menetelmävertailun vaiheista: mittausten suorittamisen sekä tulosten laskennan, analysoinnin ja arvioinnin vaiheet. Koejärjestelyjen suunnittelusta ja validointisuunnitelman teosta on vastannut toimeksiantaja: alustava validointisuunnitelma laadittiin maaliskuussa 2011 (liite 1). Tämän lisäksi toimeksiantajamme on tarkistanut SmartCycler® RT-PCR-menetelmän toimivuuden alustavasti sekä optimoinut tutkimuksessa käytetyt laitteet vastaamaan tutkimuksen tarpeita. Tutkimukseen liittyvien menetelmä- ja laadunvalvontaohjeiden laatiminen jäävät työmme rajauksen ulkopuolelle ja niistä vastaa toimeksiantaja.

6.1 Näyttemateriaali

Toimeksiantajamme keräsi tutkimuksessa käyttämämme näytteet kahdesta eri lähteestä – tutkimme PCR-referenssimenetelmällä Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksella analysoituja sekä Actim® Influenza A&B-vieritestillä tutkittuja näytteitä. Referenssi- ja vieritestimenetelmällä saadut tulokset annettiin meille tarkasteltavaksi aloittaessamme opinnäytteemme empiirisen tutkimuksen vaiheen. Validoinnissa hyödynnetyt Terveiden ja hyvinvoinnin laitokselta saadut näytteet ja vieritestillä tutkitut näytteet ajettiin tutkimuksessamme rinnakkain, yhteisissä sarjoissa. Sarjoja tutkimukseemme sisältyi seitsemän täyttä sekä yksi laitteen näytepaikkojen suhteen vajaa laimennossarja. Kaikki näytteet identifioitiin sarjanumeroilla, eikä potilaiden henkilötietoja käsitelty missään vaiheessa opinnäytetyön prosessin aikana.

6.1.1 Validoinnissa käytetyt referenssinäytteet

SmartCycler® RT-PCR-menetelmän validoinnissa käytetyt näytteet ovat potilasnäytteitä, jotka on tutkittu PCR-menetelmällä influenssa A- ja B-virusten osalta Terveiden ja

hyvinvoinnin laitoksen referenssilaboratoriossa. Näytemateriaali pyrittiin valikoimaan siten, että se vastasi validoitavan menetelmän tulevassa käytössä tutkittavaa materiaalia: mukana oli sekä influenssavirusten suhteen negatiivisia että influenssa A- ja B-positiivisia näytteitä. Osa negatiivisista näytteistä sisälsi muita hengitystiepatogeenia, kuten RSV- (engl. human respiratory syncytial virus) ja adenoviruksia, mikä auttoi osaltaan selvittämään tutkimamme menetelmän spesifisyyttä influenssavirusten suhteen.

Näytteet on lähetetty Yhtyneet Medix Laboratoriot Oy:n toimipaikkaan eppendorffputkissa, -70 °C lämpötilassa. Tiedossamme oli ainoastaan referenssilaboratorion PCR-menetelmällä saatu analyysituloks influenssa A- ja B-virusten suhteen. Muita näytekohtaisia tietoja, kuten potilaiden sukupuolta tai ikää, samoin kuin näytteenoton ajankohtaa, ei annettu tietoomme. Kaikki näytteet käsiteltiin näin ollen pelkän numerosarjan avulla. Näytemateriaali sulatettiin ennen analyysien suorittamista yhden ajon vaatima näytesarja kerrallaan. Preanalyttiset tekijät vakioitiin toimeksiantajan toimesta.

Smart Cyclo® RT-PCR-menetelmän validoinnissa käytimme THL:n referenssimenetelmällä analysoitua, yhteensä kymmentä influenssa A-positiivista näytettä, joista viisi näytettä oli influenssa A(H1N1)-positiivisia ja viisi A(H3N2)-positiivisia. Näiden lisäksi tutkimme viisi influenssa B-positiivista näytettä ja 20 influenssavirusten suhteen negatiivista näytettä. Viisi negatiivista näytettä oli todettu adenoviruspositiivisiksi ja yksi näyte RSV-positiiviseksi. Negatiiviset näytteet yhdistämällä saatiin kymmenen influenssavirusten suhteen negatiivista näytetseosta eristystä ja monistusta varten.

6.1.2 Menetelmävertailussa käytetyt vieritestinäytteet

Opinnäytetyössä käyttämämme vieritestinäytteet ovat potilasnäytteitä, joita on kerätty Yhtyneet Medix Laboratoriot Oy:n Raumantien toimipisteessä tammi- ja helmikuussa vuonna 2011. Näytteet on otettu nenätikkunäytteinä influenssavieritestiä varten potilailta, joilla on todettu influenssavirustartuntaan viittaavia klinisiä oireita. Käytetty vieritesti on Medix Biochemican Actim® Influenza A&B ja näytteet on vieritestillä analysoimisen jälkeen säilytetty kyseisen testin puskuriliuoksessa. Vieritestauksen suorittamisen jälkeen testin puskuri ja sen sisältämä näytemateriaali on säilytetty näytteenottopisteen jääkaapissa ja toimitettu seuraavalla näytekuljetuksella Yhtyneet Medix Laboratoriot Oy:n Nihtisillan toimipisteeseen pitkäaikaista säilytystä varten. Näytteiden pitkäaikai-

sessä säilytyksessä puskuriliuos ja sen sisältämä potilasnäyte on pakastettu -70 °C-asteessa. Yhtyneet Medix Laboratoriot Oy takaa, että näytteet on säilytetty asianmukaisesti ja siten säilytykseen liittyviä virhetekijöitä ei tarvitse huomioida osana tulosten arviointia. Näytteet on kerätty eri ikäluokkiin kuuluvilta potilailta, kuitenkin pääsääntöisesti aikuisilta. Vieritestauksen tulokset eivät ole vaikuttaneet menetelmävertailussa saatavien SmartCycler® RT-PCR-tulosten tulkintaan.

Työmme menetelmävertailuosiossa tutkimme viisi Actim® Influenza A&B-vieritestin antigeeniosoituksessa influenssa A-positiiviseksi tulkittua näytettä ja neljä saman testin avulla influenssa B-positiiviseksi todettua näytettä. Näiden lisäksi tutkimme SmartCycler® RT-PCR-menetelmällä 48 näytettä, jotka oli vieritestin antigeeniosoituksen perusteella todettu influenssa A- ja B-negatiivisiksi sekä kaksi näytettä, joiden vieritestituloksen oli tulkittu olevan positiivinen sekä influenssa A- että influenssa B-virusta kohtaan.

6.2 Työn suoritus

Toimeksiantajamme varmisti alustavasti tutkimuskohteenamme olevan SmartCycler® RT-PCR-menetelmän toimivuuden ja optimoi samalla menetelmän muuttujat ennen opinnäytteeseemme liittyvää tutkimusosiota. Opinnäytetyön varsinainen empiirinen osuus suoritettiin Yhtyneet Medix Laboratoriot Oy:n Nihtisillan toimipisteessä touko-kesäkuussa 2011. Työmme ohjaaja, erikoistuva kemisti Johanna Westerlund, perehdytti meitä muutaman päivän ajan laitteiden käyttöön ja työn toteutukseen liittyen, minkä jälkeen suoritimme itsenäisesti influenssavirusten eristämisvaiheen NucliSens® easy-MAG®-laitteella sekä monistamisvaiheen SmartCycler®-laitteella. Halusimme molempien oppivan tutkimuksen eri osuuksien käytännön suorittamisen ja siksi osallistuimme molemmat laboratoriotutkimusosion jokaiseen vaiheeseen.

Näytteiden eristys ja monistus suoritettiin Yhtyneet Medix Laboratoriot Oy:n laatiman alustavan työohjeen mukaisesti. Pakastetut näytteet säilytettiin tutkimuksen eri vaiheiden välisen ajan viileässä RNA:n hajoamisen estämiseksi. Työskentelimme immunovirologian laboratoriotiloihin kuuluvissa, toisistaan erillään olevissa huoneissa: ensimmäinen huone oli näytteiden esikäsittelyä ja eristämistä varten ja toinen reagenssiseoksen valmistamista sekä näytteiden ja reagenssiseoksen yhdistämistä varten (pre-PCR huone). Lisäksi tutkimuksessa hyödynnettiin kolmatta, näytemateriaalin monistamisvaiheen

suorittamiseen tarkoitettua huonetta. Jokaisessa työvaiheessa käytettiin talkittomia suojakäsineitä, joita vaihdettiin työn aikana useita kertoja kontaminaation ja reaktion inhibition estämiseksi. Työskentelytasojen ja laminaarivirtauskaappien puhdistamisessa käytettiin RNase AWAY-liuosta aina työskentelyjaksojen päätyttyä. Monistushuoneessa käytettiin huonekohtaisia sisäkenkiä monistetun materiaalin muihin tiloihin leviämisen estämiseksi.

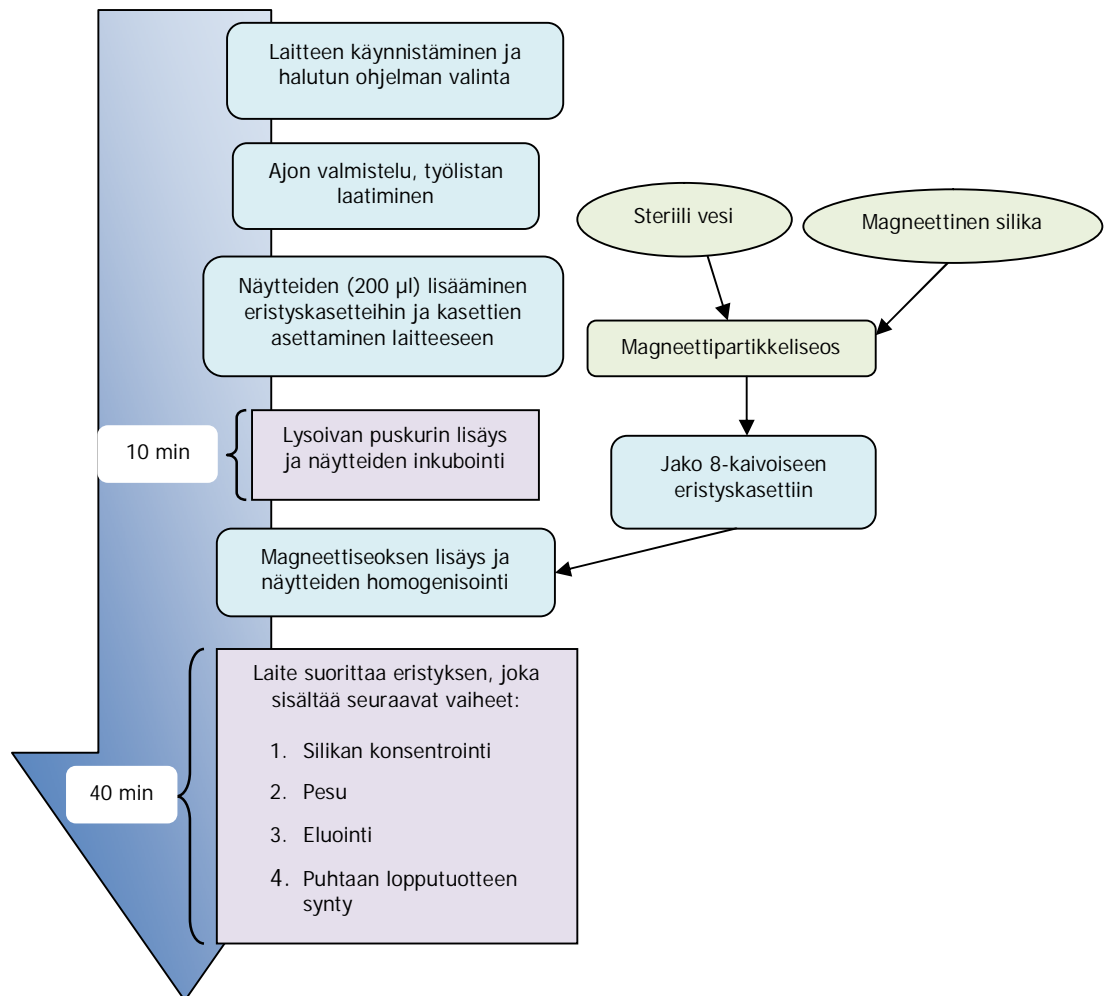
6.2.1 Näytteiden esikäsittely ja nukleinihappojen eristäminen

Influenssavirusten RNA:n eristämiseen käytimme bioMérieuxin easyMAG®-eristysautomaattia. Täysi eristyssarja käsittää 24 näytettä jaettuna kolmeen eristyskasettiin. Työssämme emme kuitenkaan hyödyntäneet täyttä näytteidenajokapasiteettia, vaan näytteet jaettiin SmartCycler®-laitteen monistuskapasiteetin kanssa yhteensopiviin 16 näytteen sarjoihin. Näytteistä laadittiin eristämistä varten työlistä, jossa ilmenivät näytenumero ja näytteen paikka eristyskasetissa. Kasetin kaivoihin pipetoitiin 200 µl näytettä, käyttäen suodattimen sisältäviä pipetinkärkiä aerosolimuodostumisen estämiseksi. Eristys suoritettiin laitevalmistajan ohjeiden mukaisesti.

Jokaisen näytteen yhteydessä käytettiin sisäisenä monistuskontrollina Cepheid® SPC-helmeä (engl. sample process control). SPC-helmet sisältävät suojattuja, kylmäkuivatussa muodossa olevia RNA-SPC-rakenteita (engl. armored RNA®), RNAasi-inhibiittoreita sekä polyA-RNA:ta. Sisäisen monistuskontrollin avulla kyetään estämään inhiboivista tekijöistä aiheutuvat väärät negatiiviset tulokset. (Cepheid.) Muutamissa ajosarjoissa helmi lisättiin näytteiden esikäsittelyvaiheessa (sarjat 1–4) ja toisissa vasta laitteella suoritettavan lysoinnin jälkeen (sarjat 5–7). Jokaiseen eristyskasettiin lisättiin eristettävien näytteiden lisäksi 200 µl prosessikontrollina toimivaa steriiliä vettä.

Näytekasetit asetettiin easyMAG®-eristysautomaattiin, minkä jälkeen influenssavirusten RNA eristettiin niin sanotulla yleisohjelmalla (engl. generic). Eristysohjelman alussa näytemateriaalin solumassa hajotettiin 10 minuuttia kestävällä, laitteen suorittamalla lysoinnilla. Lysoinnin jälkeen jokaiseen näytekuoppaan lisättiin 125 µl NucliSens® easyMAG®-magneettipartikkeliseosta, joka laimennettiin ennen lisäystä steriilillä vedellä (0,6 ml magneettipartikkeleita + 550 µl steriiliä vettä). Tämän vaiheen jälkeen seurasi 40 minuutin mittainen, laitteen suorittama eristysvaihe. Laitteen eluointilavuudeksi

ohjelmoitiin 60 µl. Kuviossa 4 esitämme NucliSens® easyMAG®-eristysautomaatilla suoritettujen eristysten vaiheet (kuvio 4).



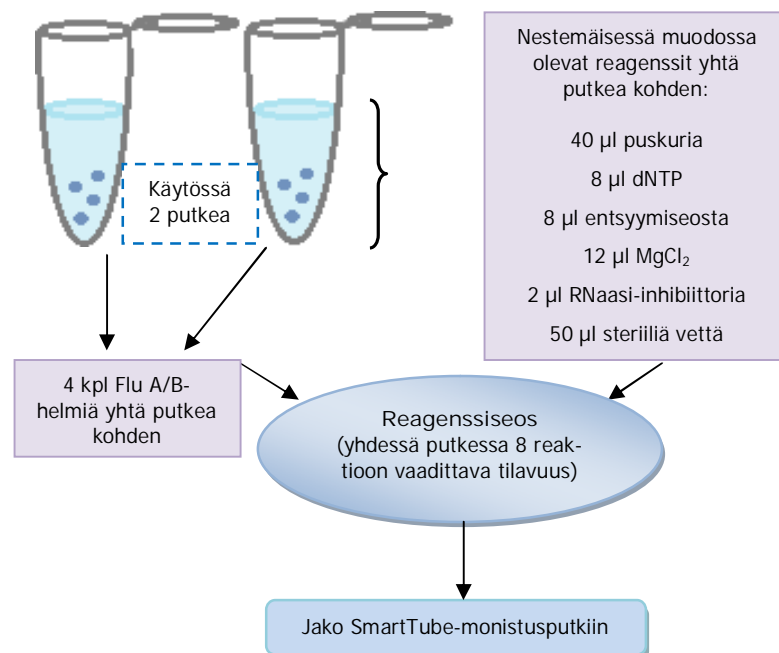
Kuvio 4. NucliSens® easyMAG®-eristysautomaatilla suoritettujen eristysten vaiheet. Lilanväristen, suorakulmaisten muotojen sisältö vastaa laitteen automaattisesti tekemiä työvaiheita ja sinisellä pohjalla, pyöreäkulmaisissa muodoissa on esitetty manuaalisesti suoritettuja työvaiheita.

Eristysvaiheen jälkeen eluaatit siirrettiin numeroituihin eppendorffputkiin ja tämän jälkeen säilytettäväksi jälle. Eristyskasettien sisältämät, prosessikontrolleina toimivat steriili vesi -näytteet yhdistettiin samaan eppendorffputkeen. Menetelmävalidoinnissa ja -vertailussa tutkitut näytteet käsiteltiin rinnakkain ja niille suoritettiin eristysvaihe osittain samoissa sarjoissa. (EasyMAG User Manual.)

6.2.2 Reagenssiseoksen valmistus

Nukleiinihappomonistuksessa käytettävä reagenssiseos (engl. mastermix) valmistettiin ennen jokaista monistussarjaa kaupallisista reagensseista. Reagenssiseos tehtiin kahdessa eppendorfputkessa niin, että yhden putken seos riitti yhteensä kahdeksaan reaktioon.

Molempiin reagenssiseosta sisältäviin eppendorfputkiin lisättiin aluksi neljä Cepheidin valmistamaa Smart Cycler® Flu A/B Reagents Primer and Probe Set-reagenssihelmeä. Helmet sisältävät influenssa A- ja B-monistusreaktioille spesifisiä alukkeita, FAM™- ja Alexa Fluor®-leimattuja koettimia, SPC-sekvenssiä varten suunniteltuja spesifisiä alukkeita sekä Texas Red®-koettimia. Tämän jälkeen putkiin lisättiin Qiagen® One-Step RT-PCR-reagenssipakkauksesta 40 µl (5x) puskuria, 8 µl (10 mM) dNTP:tä ja 8 µl entsyymiseosta (liite 3). Näiden reagenssien lisäksi seokseen lisättiin 12 µl (25 mM) MgCl₂-liuosta (Fermentas), 2 µl (40 U/µl) RNAasi-inhibiittoria (Promega) ja 50 µl steriiliä vettä (Qiagen). Reagenssiseoksen valmistusvaiheet on kuvattu alla olevassa kuviossa (kuvio 5). Seos sekoitettiin hyvin koeputkiravistelijalla ja sentrifugoitiin tämän jälkeen eppendorfputkien pohjalle 5–10 sekunnin ajan pienessä pöytäseentrifugissa.



Kuvio 5. Reagenssiseoksen valmistusvaiheet.

Ajoon tarvittava määrä SmartTube-monistusputkia (16 kpl sarjoissa 1–7 ja 8 kpl sarjassa 8) sijoitettiin valmiiksi jäädytettyyn kylmäblokkiin, minkä jälkeen jokaiseen monistusputkeen pipetoitiin 15 µl reagenssiseosta. Tämän jälkeen putket suljettiin ja kylmäblokki monistusputkineen siirrettiin pre-PCR-tilan vetokaappiin näytteiden pipetointia varten. Jokaisesta eristetystä, jäissä säilytetystä näytteestä sekä prosessikontrollista pipetoitiin 10 µl tilavuus omaan numeroituun monistusputkeensa. Vain yksi näyte ja sille varattu monistusputki olivat kerrallaan käsiteltävinä ristikontaminaation estämiseksi. Monistusputkien korkit suljettiin tiiviisti heti pipetoinnin jälkeen.

6.2.3 Monistaminen SmartCycler®-laitteella

Varsinainen monistusreaktio tapahtui PCR-tilassa Smart Cycler®-laitteen suorittaman one-step-menetelmää hyödyntäen. PCR-laite ja Smart Cycler-ohjelma käynnistettiin ennen monistusta. Ajon nimeämisen jälkeen valitsimme "FATA25 dye set"-toiminnon ja tällä mahdollistimme käyttämiemme leimojen tunnistamisen PCR-laitteessa. Laadimme jokaista ajoa varten tietokoneohjelmiston avulla työlistan, jossa ilmeni yksittäisten näytteiden tunnistenumerot sekä paikat laitteen sisällä. Valmiiksi laaditun ohjeen avulla valittiin influenssavirusten monistusta varten "Cepheid_Influenssa"-ohjelma.

SmartTube-reaktioputkia sentrifugoitiin 5–10 sekunnin ajan niille tarkoitetussa Cepheidin valmistamassa sentrifugissa, jotta näytemateriaali ja reaktioseos saatiin asettumaan reaktioputken pohjalle. Samalla reaktioputken sisältämä liuos saatettiin homogeeniseen, hyvin sekoitettuun muotoon. Putket asetettiin työlistan mukaisesti numerojärjestyksessä Smart Cycler®-laitteeseen, varmistettiin että jokainen putki oli kiinni tiiviisti ja lopuksi näytekammion kannet suljettiin. Tämän jälkeen ajo käynnistettiin. Ohjelma suoritti ensin normaalia denaturaatiovaihetta pidemmän alkudenaturaation, minkä jälkeen varsinainen monistussykli toistui 40 kertaa.

- | | | |
|----|--------------------|-----------------------------|
| 1. | 50 °C 30 minuuttia | |
| 2. | 95 °C 15 minuuttia | |
| 3. | 94 °C 15 sekuntia | } sykliden toisto 40 kertaa |
| 4. | 60 °C 45 sekuntia | |
| 5. | 72 °C 15 sekuntia | |

7 Tutkimustulokset

Työmme tulokset jakautuvat kahteen osioon tutkimuksemme jaon mukaisesti. Ensimmäinen osio käsittelee menetelmävalidoinnista saatuja tuloksia: arvioimme tulosten merkitystä menetelmän hyödynnettävyyteen toimeksiantajamme tavoitteiden mukaisessa diagnostisessa käytössä. Menetelmävalidoinnin tulokset käsitellään eriteltyinä tutkimiemme parametrien suhteen. Toisessa osiossa esitämme menetelmävertailun tulokset, joiden kautta arvioimme, soveltuuko Actim® Influenza A&B-vieritestauksesta peräisin oleva näyte-puskuriliuos kohdemenetelmämme näytemateriaaliksi. Menetelmävertailun tuloksina käsittelemme vieritestin herkkyys- ja spesifisyystasot sekä käymme läpi vertailussa esiintyvät poikkeavat tulokset.

Liitteessä 4 on SmartCycler® RT-PCR-menetelmän avulla tuotetut monistuskäyrät ja Ct-arvot jokaisen sarjan osalta. Kaikki SmartCycler® RT-PCR-menetelmällä saadut tulokset on esitetty myös liitteessä 5, jossa jokaisen näytteen kohdalla esitellään validoidulla menetelmällä saatu tulos, näytteen Ct-arvo, sisäisen prosessikontrollin (SPC) tulos sekä näytteelle aikaisemmin Actim® Influenza A&B-vieritestillä tai referenssimenetelmällä saatu tulos.

7.1 Validoinnin tulokset

SmartCycler® RT-PCR-menetelmän validoinnissa tutkittaviksi parametreiksi valittiin kohdemenetelmän herkkyys, spesifisyys, toistettavuus, uusittavuus ja lineaarisuus. Saamamme tulokset vastasivat lähes systemaattisesti THL:n referenssimenetelmällä saatuja tuloksia. Tutkimustulosten analysoinnin jälkeen kohdemenetelmämme havaittiin olevan suunniteltuun käyttötarkoitukseensa sopiva kaikkien tutkittavien parametrien osalta.

7.1.1 Kvalitatiivinen herkkyys ja spesifisyys

SmartCycler® RT-PCR-menetelmän validoinnissa saadut herkkyys- ja spesifisyystasot laskettiin vertaamalla menetelmällä saatuja tuloksia THL:n referenssimenetelmällä saattuihin tuloksiin. Validointitulokset on laskettu erikseen influenssa A- ja influenssa B-virusten osalta. Tulokset on esitetty alla olevissa taulukoissa (taulukko 1 ja taulukko 2).

Kaikki referenssimenetelmällä saadut negatiiviset tulokset osoittautuivat myös SmartCycler® RT-PCR-menetelmällä negatiivisiksi ja herkkyystaso oli sekä influenssa A- että influenssa B-viruksen kohdalla 100 %. Yksi referenssimenetelmän avulla influenssa A(H3N2)-positiiviseksi tulkittu näyte (näyte 146) osoittautui kohdemenetelmällämme negatiiviseksi. Tämä aiheutti spesifisyystason laskun 93,8 %:iin influenssa A-viruksen osalta. Näytteen tulos varmistettiin uusimalla näytteen analyysi toisessa ajosarjassa. Tässä kontrollitutkimuksessa näyte osoittautui positiiviseksi. Mikäli otamme huomioon uusinta-ajon tuloksen, menetelmän spesifisyys nousee 100 %:iin. (taulukko 1).

Taulukko 1. SmartCycler® RT-PCR-menetelmän kvalitatiivinen herkkyys ja spesifisyys influenssa A-viruksen määrittämisessä.

SmartCycler® RT-PCR	Referenssimenetelmä (THL) PCR		
	A-positiivinen	A-negatiivinen	Yhteensä
A-positiivinen	9	0	9
A-negatiivinen	1 *	15	16
Herkkyys	100 %		
Spesifisyys	93,8 %		

* uusinnassa positiivinen

Referenssimenetelmällä tehdyssä tutkimuksessa influenssa B-positiivisiksi osoittautuneiden näytteiden tulokset olivat vastaavat SmartCycler® RT-PCR-menetelmää hyödynnettäessä. SmartCycler® RT-PCR-menetelmän spesifisyystaso on tutkimuksessamme influenssa B-viruksen kohdalla 100 %. (taulukko 2.)

Taulukko 2. SmartCycler® RT-PCR-menetelmän kvalitatiivinen herkkyys ja spesifisyys influenssa B-virusta määrittämisessä.

SmartCycler® RT-PCR	Referenssimenetelmä (THL) PCR		
	B-positiivinen	B-negatiivinen	Yhteensä
B-positiivinen	5	0	5
B-negatiivinen	0	20	20
Herkkyys	100 %		
Spesifisyys	100 %		

7.1.2 Toistettavuus ja uusittavuus

Validoitavan SmartCycler® RT-PCR-menetelmän toistettavuus määriteltiin ajamalla jo aikaisemmassa ajosarjassa varmistettu korkea positiivinen tulos uudestaan toisessa ajosarjassa. Korkealla positiivisella tuloksella tarkoitetaan tässä yhteydessä influenssa A- tai B-positiivisesta näytteestä saatua, muihin positiivisiin tuloksiin nähden matalaa Ct-arvoa.

Toistettavuusmittauksessa käytimme kolmea näytettä: influenssa A(H1N1)-positiivista (näyte 467), influenssa A(H3N2)-positiivista (näyte 145) ja influenssa B-positiivista (näyte 644) näytettä. Kaikista rinnakkaismäärittäyksistä saatuja Ct-arvoja verrattiin keskenään ja niistä laskettiin keskiarvo, keskihajonta sekä variaatiokerroin kappaleessa 4.2 esitettyjen kaavojen mukaisesti (kaavat 1 ja 2). Rinnakkaismäärittäysten toistettavuutta käsittelevät tulokset näkyvät alla olevassa taulukossa (taulukko 3).

Taulukko 3. Validoitavan SmartCycler® RT-PCR-menetelmän toistettavuuden määrittäminen rinnakkaismittausten avulla.

Näyte	Löydös	Sarja	Ct-arvot	Keskiarvo (ka)	Keskihajonta (SD)	Variaatiokerroin (CV %)
467	Influenssa A(H1N1)	2	22,72	22,73	0,186	0,82
		4	22,56			
		5	22,93			
145	Influenssa A(H3N2)	2	27,32	27,28	1,050	3,85
		5	27,96			
		6	28,05			
		7	25,78			
644	Influenssa B	3	17,50	17,04	0,673	3,95
		5	16,40			
		6	16,53			
		8	17,73			

Sarjojen välinen variaatio oli tutkituissa näytteissä hyvin pieni, mikä osoittaa SmartCycler® RT-PCR-menetelmän toistettavuuden olevan hyvä. Influenssa A(H1N1)-positiivinen näyte 467 analysoitiin kolmessa eri sarjassa, jolloin variaatiokertoimeksi saatiin heikohko 0,82 %. Influenssa A(H3N2)-positiivinen näyte 145 ja influenssa B-positiivinen näyte 644 analysoitiin neljässä sarjassa. Ensiksi mainitusta näytteestä tehtyjen analyysien avulla variaatiokertoimeksi määritettiin 3,85 % ja toisen näytteen osalta vastaavaksi arvoksi saatiin 3,95 %.

Tehdyillä toistomittauksilla voidaan myös osoittaa SmartCycler® RT-PCR-menetelmän hyvä uusittavuus. Uusittavuuden arvioinnissa on otettava huomioon, että analysoinnin vaiheiden suorittamiseen osallistui kaksi henkilöä. Tästä huolimatta sarjojen välinen variaatio on Ct-arvojen perusteella hyvin pieni ja tämä näkyy muun muassa näytteiden matalassa keskihajonnassa.

7.1.3 Oikeellisuus

SmartCycler® RT-PCR-menetelmän oikeellisuus voidaan osoittaa tutkimuksemme tulosten hyvällä korrelaatiolla suhteessa referenssimenetelmällä saatuihin tuloksiin. SmartCycler®-menetelmällä määritetyt tulokset erosivat referenssimenetelmällä saatuihin tuloksiin vain yhden influenssa A-positiivisen näytteen osalta (näyte 146): saimme kyseisestä näytteestä väärän negatiivisen tuloksen sarjassa 3. Näyte uusittiin sarjassa 5, jolloin saatu tulos oli positiivinen influenssa A-viruksen suhteen. SmartCycler® RT-PCR-menetelmällä analysoidut ja referenssimenetelmällä varmistetut näytteet antoivat sekä influenssa A-viruksia että influenssa B-viruksia osoittaessa 100 %:n spesifisyytasot. Herkkyytaso oli influenssa A-virukselle 93,8 % ja influenssa B-virukselle 100 %. Näiden tulosten perusteella validoidulla menetelmällä saatuja tuloksia voidaan pitää oikeina.

7.1.4 Lineaarisuus

Menetelmän lineaarisuus osoitettiin laimentamalla kolme vahvaa positiivista referenssinäytettä steriiliin veteen laimennossuhteilla 1:1, 1:10, 1:100 ja 1:1000 sekä mittaamalla laimennokset rinnakkaisina määrittäisinä. Laimennossarjojen avulla oli lineaarisuuden lisäksi mahdollista määrittää SmartCycler® RT-PCR-menetelmän herkkyys ilman varsinaista kvantitaatiota. Menetelmän tarkan kvantitatiivisen herkkyyden osoittaminen vaa-

tii menetelmän toteamisrajan määrittämisen tunnetuilla standardinäytteillä. Opinnäytteen tutkimuksen yhteydessä edellä mainitulle määrittämiselle ei ollut tarvetta, sillä tavoitteenamme oli validoida kvalitatiivisella tasolla tuloksia tuottava menetelmä.

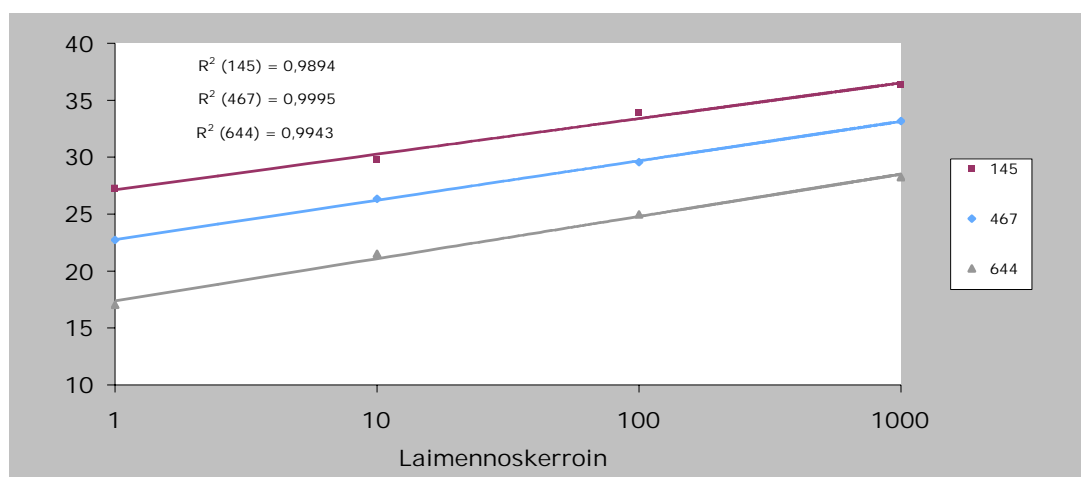
Laimennossarjat tehtiin samoista näytteistä, joiden avulla osoitettiin menetelmän toistettavuus. Käytimme siis tässä yhteydessä influenssa A(H1N1)-positiivista (näyte 467), influenssa A(H3N2)-positiivista (näyte 145) ja influenssa B-positiivista (näyte 644) näytettä. Saatujen Ct-arvojen rinnakkaiset tulokset sekä tuloksista lasketut keskiarvot näkyvät alla olevassa taulukossa (taulukko 4).

Taulukko 4. Laimennossarjojen rinnakkaismäärittämisestä saadut Ct-arvot sekä niistä lasketut keskiarvot.

Influenssa A(H1N1) 467		
Laimennos	Rinnakkaismittausten Ct-arvot	Ct-arvojen keskiarvo
1:1	22,72	22,74
	22,56	
	22,93	
1:10	26,38	26,34
	26,30	
1:100	29,49	29,57
	29,64	
1:1000	33,10	33,19
	33,27	
Influenssa A(H3N2) 145		
Laimennos	Rinnakkaismittausten Ct-arvot	Ct-arvojen keskiarvo
1:1	27,32	27,28
	27,96	
	28,05	
	25,78	
1:10	29,85	29,79
	29,72	
1:100	34,35	33,89
	33,43	
1:1000	35,66	36,35
	37,04	

Influenssa B 644		
Laimennos	Rinnakkaismittausten Ct-arvot	Ct-arvojen keskiarvo
1:1	17,50	17,04
	16,40	
	16,53	
	17,73	
1:10	21,60	21,52
	21,44	
1:100	24,75	24,96
	25,18	
1:1000	28,17	28,26
	28,34	

Rinnakkaisista mittaustuloksista saadut keskiarvot suhteutettiin kyseiseen laimennoskertoimeen, ja näin kyettiin muodostamaan lineaarisuutta osoittava käyrä kaikille kolmelle näytteelle (kuvio 4). Kuviossa 4 esiintyy laimennossarjojen regressiosuorat sekä jokaisen laimennetun näytteen arvoille määritelty korrelaatiokerroin. Näytteen 145 laimennoksissa korrelaatio on noin 0,99 ja näytteiden 467 ja 644 osalta laimennosten korrelaatio on yli 0,99. Tämä osoittaa, että korrelaatio on kaikissa kolmessa laimennossarjassa hyvin korkea ja lisäksi mitattujen Ct-arvojen välillä on voimakas positiivinen korrelaatio. Näiden havaintojen avulla voimme osoittaa menetelmän korkean lineaarisuuden.



Kuvio 6. Menetelmän lineaarisuuden osoittaminen kolmesta näytteestä tehtyjen laimennossarjojen avulla. Korrelaatiokerroin influenssa A(H3N2)-positiiviselle näytteelle 145 on noin 0,99 ja vastaavasti influenssa A(H1N1)-positiiviselle 467 ja influenssa B-positiiviselle näytteelle 644 yli 0,99.

Reaaliaikaisessa PCR-reaktiossa tulokseksi saatu Ct-arvo on verrannollinen näytteessä olevaan nukleiinihappopitoisuuteen niin, että kaksinkertainen templaatin pitoisuus antaa yhden syklin verran matalamman Ct-arvon. Tämän avulla voidaan myös osoittaa, että kymmenkertainen templaatin muutos vaikuttaa tuloksen Ct-arvoon noin 3,3 syklin verran, mikäli reaktion tehokkuustaso on 100 %. Verrattaessa laimennossarjoista saamiemme Ct-arvoja (taulukko 4 ja kuvio 4), voidaan huomata samantyyppinen syklien määrän nousu Ct-arvoissa jokaisen kymmenkertaisen laimennoksen kohdalla. Nämä tulokset osoittavat, että reaktioseoksessa ei ole esiintynyt reaktiota häiritseviä tekijöitä ja että reaktion tehokkuus on suhteellisen korkea. Tulokset viittaavat myös siihen, että eristetty RNA on ollut puhdas ja eristysautomaatti on toiminut tehokkaasti ja luotettavasti.

7.2 Menetelmävertailun tulokset

Validoinnin tulokset osoittavat SmartCycler® RT-PCR-menetelmän tulosten korreloivan hyvin referenssimenetelmällä saatuihin tuloksiin. Tästä seurauksena pystyimme asettamaan herkäksi ja spesifiseksi todetun, validoinnin kohteena olleen SmartCycler® RT-PCR-menetelmän referenssimenetelmän rooliin menetelmävertailussa Actim® Influenza A&B-vieritestin kanssa. Menetelmävertailun vieritestimenetelmälle laskettiin kvalitatiiviset herkkyys- ja spesifisyystasot vertaamalla vieritestissä saatuja tuloksia SmartCycler® RT-PCR-menetelmällä saatuihin vastaaviin tuloksiin.

Viidestä A-positiiviseksi todetusta näytteestä neljä näytettä osoittautui positiivisiksi ja yksi näyte negatiiviseksi SmartCycler® RT-PCR-menetelmällä tutkittaessa. Tästä johtuen Actim® Influenza A&B-vieritestin kvalitatiivinen herkkyystaso influenssa A-viruksen määrittelyssä oli 80 %. Viidestäkymmenestä kahdesta vieritestissä influenssa A-negatiiviseksi todetusta näytteestä vain 49 osoittautui SmartCycler® RT-PCR-menetelmällä negatiiviseksi, ja kolme näytettä antoi RT-PCR-menetelmää hyödynnettäessä positiivisen tuloksen influenssa A-viruksen suhteen. Koska negatiivisia näytteitä oli menetelmävertailussa suhteellisen paljon, kolme poikkeavaa tulosta eivät vaikuttaneet voimakkaasti spesifisyystasoa laskien. Vieritestin spesifisyys oli tulosten perusteella 94,2 % influenssa A-viruksen suhteen. (taulukko 5.)

Taulukko 5. Actim® Influenza A&B-vieritestin influenssa A-viruksen kohtaan osoittama herkkyys ja spesifisyys verrattuna validoituun Smart Cycler® RT-PCR menetelmään.

Actim® Influenza A&B-vieritesti	Referenssimenetelmä SmartCycler® RT-PCR		
	A-positiivinen	A-negatiivinen	Yhteensä
A-positiivinen	4	1	5
A-negatiivinen	3	49	52
Herkkyys	80 %		
Spesifisyys	94,2 %		

Kaikki vieritestissä influenssa B-positiivisiksi todetut näytteet antoivat vastaavan tuloksen SmartCycler® RT-PCR-menetelmällä. Tästä johtuen Actim® Influenza A&B-vieritestin kvalitatiivinen herkkyystaso oli 100 %. Myös vieritestin spesifisyys oli tulosten perusteella 100 % influenssa A-viruksen suhteen, koska kaikki vieritestissä influenssa B-negatiiviseksi todetut näytteet osoittautuivat vastaavasti negatiivisiksi SmartCycler® RT-PCR-menetelmällä tutkittuina. (taulukko 6.)

Taulukko 6. Actim® Influenza A&B-vieritestin influenssa B-viruksen kohtaan osoittama herkkyys ja spesifisyys verrattuna validoituun Smart Cycler® RT-PCR-menetelmään.

Actim® Influenza A&B-vieritesti	Referenssimenetelmä SmartCycler® RT-PCR		
	B-positiivinen	B-negatiivinen	Yhteensä
B-positiivinen	4	0	4
B-negatiivinen	0	53	53
Herkkyys	100 %		
Spesifisyys	100 %		

Laadimme taulukon kaikista menetelmävertailussa saaduista poikkeavista tuloksista (taulukko 7). Yksi vieritestissä saatu influenssa A-positiivinen tulos oli SmartCycler® RT-PCR-menetelmällä negatiivinen. Jopa kolme vieritestillä alun perin negatiivisiksi tulkittua tulosta osoittautui SmartCycler® RT-PCR-menetelmällä influenssa A-positiivisiksi.

Nämä vieritestillä saadut virheelliset negatiiviset tulokset osoittavat RT-PCR-menetelmän herkkyyden verrattuna vieritestimenetelmään. Näiden tulosten lisäksi vertasimme kahta vieritestissä tuplainfektioksi epäiltyä tulosta RT-PCR-menetelmään. Molempien näytteiden kohdalla SmartCycler® RT-PCR-menetelmällä varmistettu tulos osoitti näytteiden sisältävän ainoastaan influenssa B-virusta. Näiden näytteiden varmistuminen influenssa B-positiiviseksi herättää epäilyä vieritestin tulosten virheellisestä tulkinnasta.

Taulukko 7. Menetelmävertailussa esiintyvät poikkeavat tulokset.

Näytenumero	Smart Cycler® RT-PCR	Actim® Influenza A&B-vieritesti
DX92392	negatiivinen	A
DX92032	A	negatiivinen
DX91798	A	negatiivinen
DX93997	A	negatiivinen
DX101119	B	A & B
DX95740	B	A & B

8 Tulosten luotettavuuden arviointi

Opinnäytetyömme tutkimustulosten luotettavuuden (reliabiliteetin) arvioinnissa otamme huomioon tutkimuksen pätevyyden (validiteetin), toisin sanoen selvitämme, miten hyvin saamamme tulokset antavat vastauksia laatimiimme tutkimuskysymyksiin (Heikkilä 2004: 29). Tässä luvussa käsittelemme ensin tutkimuskysymyksiä ja pyrimme vastaamaan niihin mahdollisimman hyvin saatujen tulosten perusteella. Tämän jälkeen arvioimme kaikkien validoinnissa saatujen tulosten luotettavuutta.

Ensimmäisessä tutkimuskysymyksessä haemme vastausta siihen, miten hyvin validoidulla SmartCycler® RT-PCR-menetelmällä saadut tulokset korreloivat referenssilaboratoriossa saatuihin tuloksiin. Tuloksemme osoittavat, että validoidulla menetelmällä saadut tulokset ovat yhtä influenssa A-positiivista näytettä osoittavaa tulosta lukuun ottamatta identtiset referenssilaboratoriossa saatuihin tuloksiin. Spesifisyystaso sekä

influenssa A-virukselle että influenssa B-virukselle olivat 100 % referenssimenetelmään verrattuna. Tämä on osoitus siitä, että SmartCycler® RT-PCR-menetelmällä saadut tulokset korreloivat referenssilaboratoriossa saatuihin tuloksiin todella hyvin.

Toisen tutkimuskysymyksen ohjaamina selvitimme, mikä on validoitavan SmartCycler® RT-PCR-menetelmän luotettavuustaso osoitettaessa influenssa A- ja influenssa B-virusten nukleiinihapporakenteita ja eroteltaessa niitä toisistaan. Tämän kysymyksen kohdalla palaamme ensimmäisen tutkimuskysymyksen vastaukseen, jossa herkkyys- ja spesifisyystasot osoittautuivat korkeiksi verratessa tuloksia referenssilaboratoriossa saatuihin tuloksiin. Tämän lisäksi menetelmä osoitti validoinnissa hyvää toistettavuutta, uusittavuutta ja lineaarisuutta ja kaikkien näiden parametrien tulokset viestivät menetelmän korkeasta luotettavuustasosta. Toistettavuus ja lineaarisuus määritettiin sekä influenssa A-positiivisilla että influenssa B-positiivisella näyttemateriaalilla.

Seuraavat kaksi tutkimuskysymystä koskevat menetelmävertailua SmartCycler® RT-PCR-menetelmän ja Actim® Influenza A&B-vieritestin välillä. Tutkimme, mikä Actim® Influenza A&B-vieritestin herkkyys- ja spesifisyystaso on verratessa vieritestauksen yhteydessä kerättyjen näyttemateriaalien tuloksia SmartCycler® RT-PCR-menetelmällä saatuihin tuloksiin. Lisäksi tutkimme, kuinka yhdenmukaisia vieritestillä ja RT-PCR-menetelmällä saadut tulokset ovat keskenään.

Menetelmävertailun tulokset osoittavat, että vieritestin herkkyys ja spesifisyys olivat influenssa B-viruksen osalta (n=4) 100 % verrattuna validoimaamme SmartCycler® RT-PCR-menetelmään. Influenssa A-viruksen kohdalla (n=5) herkkyys oli matalampi ja spesifisyys 94,2 %. Tuloksissa on otettava huomioon pienestä otoksesta johtuva suuri prosentuaalinen vaikutus ja tämän takia määritetyistä Actim® Influenza A&B-menetelmän herkkyys- ja spesifisyystasoista ei tämän opinnäytetyön tulosten perusteella voida tehdä johtopäätöstä vieritestin luotettavuudesta. Tulokset antavat ainoastaan viitteen siitä, että SmartCycler® RT-PCR-menetelmä olisi herkempi ja spesifisempi kuin Actim® Influenza A&B-vieritesti osoitettaessa influenssa A-viruksen läsnäoloa nenän limakalvonäytteessä. Emme vastaavasti voi todeta eroja vieritestin antigeeniosoituksen ja RT-PCR-menetelmän välillä influenssa B-virusmäärityksissä.

Taulukossa 7 esitämme menetelmävertailussa esiintyvät poikkeavat tulokset, joiden avulla voidaan arvioida Actim® Influenza A&B-vieritestillä ja SmartCycler® RT-PCR-menetelmällä saatujen tulosten yhtenevääsyyttä. Kahden näytteen kohdalla anti-geeniosoituksessa saatu positiivinen influenssa A- ja B-tuplainfektiotulos antoi RT-PCR-menetelmässä positiivisen tuloksen vain influenssa B-viruksen osalta. Tämä herättää epäilyn siitä, että vieritestitulokset on tulkittu kyseisissä määrityksissä virheellisesti tai toisaalta ne on voitu kirjata väärin.

Tulosten luotettavuutta on syytä tarkastella kaikkien tutkimusprosessin vaiheiden osalta, ei ainoastaan lopullisten tulosten kautta. Tästä johtuen haluamme korostaa, että toimeksiantajamme on suorittanut validoinnissa käytettyjen laitteiden soveltuvuuden arvioinnin ennen validoinnin suorittamista. SmartCycler®-laitteen toimivuus on testattu aikaisempien tutkimustarpeiden yhteydessä ja laite on kalibroitu ennen tutkimusvaiheemme toteutusta. Validoinnissa käytetty easyMAG®-eristysautomaatti on verifioitu limakalvonäytteille laitehankinnan yhteydessä. (liite 1.)

Nukleiinihappomonistuksen tulosten luotettavuuden varmistamiseksi olemme käyttäneet jokaisessa sarjassa prosessikontrollina steriiliä vettä, sisäistä monistuskontrollia (SPC) sekä referenssilaboratoriossa tutkittuja influenssa A- ja B-positiivisia näytteitä. Sisäinen monistuskontrolli lisättiin jokaiseen näyteputkeen tutkittavan näytemateriaalin ja reaktioseoksen lisäksi. Toimiva monistuskontrolli monistuu ja antaa positiivisen signaalin jokaisessa reaktiossa. Monistuskontrollin signaali saattaa inhiboitua poikkeustapauksissa selkeiden influenssa A- ja B-positiivisten näytteiden yhteydessä. Monistuskontrollin avulla voidaan poissulkea inhibitiosta johtuvat väärät negatiiviset tulokset.

Validoinnin aikana huomasimme, että käyttämämme monistuskontrolli ei toiminut halutulla tavalla (liite 5). Toimeksiantajamme selvitti asiaa (yhteydenotto kontrollin valmistajaan), jolloin selvisi, että kyseinen kontrollierä on tuottanut ongelmia muissakin tutkimuksissa. Normaalisti tuloksia ei saisi hyväksyä, jos monistuskontrolli ei anna positiivista signaalia. Tästä huolimatta voimme pitää validoinnissa saatuja tuloksia oikeina ja luotettavina, koska tulosten korrelaatio referenssilaboratoriossa saatuihin tuloksiin on korkea. Tämän lisäksi negatiivisista kontrolleista saadut tulokset olivat kaikissa ajosarjoissa influenssa A- ja B-negatiivisia, eikä ristikontaminaatiota esiintynyt.

Saamamme tulokset osoittavat kohdemenetelmämme olevan sopiva hyödynnettäväksi influenssa A- ja B-virusinfektioiden kvalitatiivisella tasolla tapahtuvassa osoittamisessa silloin, kun tarkoituksena on diagnosoida potilaan influenssavirusinfektio tai sulkea pois sen mahdollisuus. Validoimamme menetelmä liitetään Yhtyneet Medix Laboratoriot Oy:n tutkimusvalikoimaan ja tarkoitukseen sopivan markkinoinnin kautta toivomme sen palvelevan toimeksiantajamme asiakkaiden influenssadiagnostisia tarpeita siten, että potilaille kyetään tuottamaan luotettavia tuloksia kohtuullisten vastausviiveiden puitteissa.

Osa Actim® Influenza A&B-vieritestillä negatiiviseksi tulkituista näytteistä osoittautui SmartCyclerillä positiiviseksi, mikä viestii kohdemenetelmämme käyttöarvosta toimeksiantajamme tavoitteiden mukaisessa vieritestitulosten kontrolloinnissa. Validoimaamme menetelmään perustuvan tutkimuksen hyödyntämisen kautta näytteenottokerrat ja vieritestillä saatujen vääristä negatiivisista tuloksista johtuvat haitat (esimerkiksi jatko-tutkimukset, hoidon aloittamisen viivästyminen jne.) vähenevät.

9 Pohdinta

Opinnäytetyömme rakentui neljän vaiheen kautta: alussa jäsensimme toimeksiantajamme saamamme aiheen sisällön ja tämän jälkeen laadimme työn suoritusta mukailevan suunnitelman työskentelymme tueksi. Suunnitelman valmistuttua toteutimme opinnäytteemme tutkimusvaiheen toimeksiantajamme laboratoriossa ja tutkimustulosten kokoamisen jälkeen siirryimme kirjoittamaan työmme pohjalta tutkimusraporttia. Raportti palvelee koulutusohjelmalähtöisiä tavoitteitamme, mutta toimii samalla toimeksiantajamme tavoitteita palvelevana dokumenttina heidän tarpeidensa pohjalta toteutetuista menetelmävalidoinnista ja -vertailusta.

Opinnäytetyöprosessin aikana bioanalytiikan osaamisemme syveni kokonaisvaltaisesti. Aihepiiriltään ajankohtainen, tiiviissä työelämäyhteistyössä toteutettu parityö auttoi sisäistämään alamme laadunhallinnassa keskeisten prosessien: menetelmävalidoinnin ja -vertailun vaiheita sekä kyseisten prosessien käytännön suoritukseen liittyvät vaiheet. Toimeksiantajamme aloitteesta käynnistetty opinnäytetyöprosessi osoittautui

haastavaksi, mutta opinnäytetyöltä vaadittavaan laajuuteen nähden sopivaksi. Korkeat motivaatiotasomme auttoivat meitä pitäytymään suunnittelemassamme aikataulussa ja pyrkimään johdonmukaisesti kohti itsenäisesti asettamiamme tavoitteita.

Teoriaosaamisemme laajeni opinnäytetyömme toteuttamisen eri vaiheissa virologian sekä käyttämiemme menetelmien osalta. Saimme mahdollisuuden harjoitella korkean herkkyystasonsa takia vaativien RT-PCR-menetelmään perustuvien analyysien suorittamista käytännössä työmme tutkimusvaiheessa. Samalla kohdemenetelmään sekä sitä edeltävään eristysvaiheeseen liittyvä teoriaosaamisemme tarkentui. Opimme hahmottamaan influenssadiagnostisen tutkimusprosessin kokonaisuudessaan ja arvioimaan eri tekijöiden vaikutusta analyysistä saataviin tuloksiin. Kokonaisuudessaan prosessi auttoi meitä hahmottamaan laboratorioalaa koskevia vaatimuksia diagnostiikassa käytettävien menetelmien suhteen, kun alallamme merkittävä yritys pyysi meitä mukaan uuden menetelmänsä käyttöönottoon liittyvään menetelmän oikeellisuuden varmistamisen prosessiin.

Opinnäytetyön onnistuminen vaati jatkuvaa, kriittistä ja kattavaa tiedonhakua ja uskomme näiden asioiden oppimisen palvelevan meitä myöhemmin työelämässä. Pidimme koko työskentelyn ajan yllä tiivistä kontaktia ohjaajiimme ja pyrimme hyödyntämään heidän osaamistaan oman oppimisemme sekä työn käytännön toteutuksen tukena. Ensisijaisesti toimimme kuitenkin itsenäisenä työparina, omat tavoitteemme asettaen ja työmme edistymistä tarkasti koordinoiden. Opinnäytteemme aihe ja tutkimamme kohdemateriaali vaativat syventymisen muun muassa puhdistilatyöskentelyn, herkkien RNA-virusten käsittelyn, uuden menetelmän käyttöönotolle asetettujen vaatimusten sekä alalle asetettujen säännösten teoriaan. Tuon teoriatiedon keräsimme kokoamalla laadukasta tutkimusartikkeli- ja kirja-aineistoa ja rajaamalla tämän jälkeen aineistoa tarkoituksenmukaisesti, valitsemalla tutkimuksemme taustaksi sopivaa, luotettavaa ja kohdennettua tausta-aineistoa.

Opinnäytetyöprosessi edellytti toteuttajiltaan työn organisoinnin osaamista, työnjaon ja aikataulun hallintaa sekä tavoitetasojen yhteneväiseksi sovittamista. Opimme jo työskentelyn alkuvaiheessa toimimaan toistemme näkemykset huomioiden, molempien henkilökohtaista osaamista hyödyntäen. Osasimme myös tarvittaessa joustaa molempien elämäntilanteita mukaillen ja molempien vastuulliset asenteet työtä ja opintoja koh-

taan mahdollistivat työmäärien tasaisen ja työn edistykseen tähtäävän työjaon. Parityöskentelynä toteutettu opinnäytteemme mahdollisti tutkimusprosessin varmemman laadunhallinnan, sillä tutkimusvaiheita toteutettiin vuorotellen: toisen työskennellessä toinen tarkkaili toiminnan oikeellisuutta. Parityöskentely vaatii tarkkaa aikataulutusta sovitettaessa kahden tekijän ajallisia resursseja vastaamaan yhteisen työn tarpeita. Tähän ja kahden erilaisen kirjoitustyylin yhdistämiseen liittyvät haasteet eivät kuitenkaan olleet ylitsepääsemättömiä, vaan vaativat ainoastaan kompromissien tekoa sekä yhteistyötaitojen hioutumista yhteisen tavoitteen saavuttamiseksi.

Opinnäytetyöprosessi vahvisti lisäksi viestinnän ja vuorovaikutuksen osaamista. Toisaalta työskentelimme yksilöinä, toisaalta työparina ja kaikissa työn vaiheissa pidimme yllä yhteyttä toimeksiantajaamme sekä työn toteutusta ohjaavaan opettajaan. Saimme ohjaajiltamme runsaasti arvokasta ja objektiivista, aina tarvittaessa saatavilla olevaa, työmme tarkoitusta palvelevaa ohjausta ja erityisen korvaamattomana koimme tutkimusraportin kirjoitusvaiheessa saamamme asiantuntevat ohjeet. Prosessin eri vaiheissa pidetyt seminaaritilaisuudet sekä työn lopullinen esitys toimeksiantajamme toimipisteessä harjaannuttivat meitä esiintymään julkisissa tilaisuuksissa.

Kokonaisuudessaan koimme sekä työn aiheen että sen toteuttamisen eri vaiheet mielekkäinä ja bioanalyytikon työhön valmistavina. Mielenkiintomme aiheita kohtaan kasvoi prosessin varrella ja koimme opiskelevamme yhdessä, toistemme sekä omaa oppimista reflektoiden. Kehityimme voimakkaasti tutkimuksen suorittajina ja kriittisessä tiedonhaussa. Työskentelyn mielekkyyttä lisäsi se, että tarve työlle oli työelämälähtöinen. Koemme onnistuneemme opintojemme päättötyön toteuttamisessa ja saavutaneemme tavoitteemme. Työmme tarve konkretisoituu, kun Yhtyneet Medix Laboratoriot Oy ottaa validoimamme menetelmän osaksi tutkimusvalikoimaansa, diagnostiseen käyttöön.

Menetelmävalidoinnin onnistuttua toivomme toimeksiantajamme markkinoivan riittävän laajasti kyseisellä menetelmällä tehtäviä laboratoriotutkimuksia asiakkailleen. Uudesta menetelmästä tiedottaminen on tärkeää, jotta hoitavat lääkärit tulevat tietoisiksi tutkimusvalikoiman laajentumisesta ja osaavat siten tarvittaessa pyytää referenssitestausta vieritestituloksen varmistamiseksi. Lisäksi tutkimuksemme yhteydessä ilmeni muutamia epäloogisia vieritestituloksia, jotka saattavat olla seurausta riittämättömästä tieto-

taidosta testin suorittamiseen liittyen. Kyse voi myös olla testin ominaisuuksiin liittyvästä testitulosten tulkinnan vaikeudesta. Perehdytystarvetta vieritestaustyötä tekevien keskuudessa voisi mahdollisesti kartoittaa.

Lähteet

- Applied Biosystems 2011. Real-Time PCR: Understanding CT. Verkkodokumentti. <<http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb-marketing/documents/generaldocuments/cms-053906.pdf>>. Luettu 8.6.2011.
- BioMérieux 2011. NucliSENS® easyMAG®. Verkkodokumentti. <http://www.biomerieux-usa.com/servlet/srt/bio/usa/dynPage?open=USA_PRD_LST&doc=USA_PRD_LST_G_PRD_USA_12&lang=en>. Luettu 10.10.2011.
- Bustin, S. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25, 169–193. REVIEW.
- Cepheid 2011a. SmartCycler System. Verkkodokumentti. <<http://www.cepheid.com/systems-and-software/smartcycler-system/>>. Luettu 22.9.2011.
- Cepheid 2011b. Designing Real-Time Assays on the SmartCycler® II System. Cepheid Technical Support. Smart Note 6.1, 1–8. Verkkodokumentti. <<http://www.cepheid.com/systems-and-software/smartcycler-system/>>. Luettu 22.9.2011.
- Cepheid 2009. SmartCycler® Influenza Virus A/B Reagents – Primer and probe set. Reagenssiohje. Ranska.
- Chan, Kwok Hung – Yam, Wing Cheong – Pang, Chiu Mei – Chan, Kit Man – Lam, Siu Yan – Lo, Kam Fai – Poon, Leo L. M. – Peiris, J. S. Malik 2008. Comparison of the NucliSens easyMAG and Qiagen BioRobot 9604 Nucleic Acid Extraction Systems for Detection of RNA and DNA Respiratory Viruses in Nasopharyngeal Aspire Samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 46 (7), 2195–2199.
- Cheng, S-M. – Vainionpää, R. – Zhao, P. – Li, F. – Hu, A. – Forrest, B. – Rappaport, R. 2004. Detection of influenza B in clinical specimens: comparison of high throughput RT-PCR and culture confirmation. *Virus Research* 103, 85–90. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <www.sciencedirect.com>. Luettu 8.6.2011.
- Dorak, M. Tefvik 2006: Real-Time PCR. Bios Advanced Methods, Taylor & Francis group, Iso Britannia.
- Duodecim Terveyskirjasto 2011. Verkkodokumentti. <http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=ltt03206&p_haku=spesifisyys>. Luettu 17.8.2011.
- EasyMAG User Manual, Version 1.1, atikkelin numero: 280139. Luettu 11.9.2011.
- Effler, P. – Jeong, MC. – Tom, T. – Nakata, M. 2002. Enhancing Public Health Surveillance for Influenza Virus by Incorporating Newly Available Rapid Diagnostic Tests. *Emerging Infectious Diseases* 8:1, 23–28. Luettavissa myös sähköisesti

- osoitteessa <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/8/1/01-0067_article.htm>. Luettu 13.8.2011.
- Ehder, Tapio (toim.) 2005. Kemian metrologian opas. Metrologian neuvottelukunta, Kemian ja mikrobiologian jaosto, Kemian työryhmä. Julkaisu J6/2005 Helsinki.
- Eurachem 1998. The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Pdf versio 1, Iso Britannia. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <www.eurachem.org>. Luettu 15.8.2011.
- FINAS – akkreditointipalvelu 2011. Akkreditointitoiminnan vaatimukset, arviointiperiaatteet ja oppaat, 23.3.2011. Tiedote 10. Verkkodokumentti <<http://www.mikes.fi/frameset.aspx?url=finas.aspx%3fpageID=0%26categoryID=2&langID=fi>>. Luettu 26.4.2011.
- Ghebremedhin, B. – Engelmann, I. – König, W. – König, B. 2009. Comparison of the performance of the rapid antigen detection *actim* Influenza A&B test and RT-PCR in different respiratory specimens. Journal of Medical Microbiology 58, 365–370. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <<http://jmm.sgmjournals.org/cgi/content/full/58/3/365>>. Luettu 28.3.2011.
- Greenberg, S. – Allen, M. – Wilson, J. – Atmar, R. 2002. Respiratory viral infections in adults. Current Opinion in Pulmonary Medicine 8:3, 201–208.
- Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.) 2010. Mikrobiologia 1. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Duodecim, WS Bookwell Oy Jyväskylä.
- Heinonen, S. – Silvennoinen, H. – Lehtinen, P. – Vainionpää, R. – Heikkinen, T. 2011. Feasibility of diagnosing influenza within 24 hours of symptom onset in children 1–3 years of age. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 30, 387–392. Springer. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <<http://www.springerlink.com/content/xm93k1w487816196/>>. Luettu 2.4.2011.
- Hernes, S.S – Quarsten, H. – Hagen, E. – Lyngroth, A.L. – Pripp, A.H. – Bjorvatn, B. – Bakke, P.S. 2011. Swabbing for respiratory viral infections in older patients: a comparison of rayon and nylon flocked swabs. European Journal of Microbiology and Infectious Diseases 30: 159–165. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3022161/?tool=pubmed>>. Luettu 22.9.2011.
- Higuchi, R. – Dollinger, G. – Walsh, PS. – Griffith, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology, New York, 10 (4): 413–417.
- Holland, P. – Abramson, R. – Watson, R. – Gelfand, D. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' → 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Biochemistry 88, 7276–7280.
- Huovinen – Hedman – Heikkinen – Järvinen – Meri – Vaara 2010. Mikrobiologia - Mik-

robiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 1, 470–486.

Jaarinen, Soili – Niiranen, Jukka 2005. Laboratorion analyysitekniikka. 5. uudistettu painos. EDITA, Helsinki.

Linko, Solveig 2003. Measurement tools for quality assurance in medical laboratories. Väitöskirja. Helsingin Yliopisto, Helsinki. Luettu 20.7.2011.

Loens, K. – Bergs, K. – Ursi, D. – Goossens, H. – Ieven, M. 2007. Evaluation of NucliSens easyMAG for Automated Nucleic Acid Extraction from Various Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 45 (2). 421–425. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <<http://jcm.asm.org/cgi/content/full/45/2/421>>. Luettu 1.8.2011.

Louie, Richard F. – Kitano, Tyler – Brock, Keith, T. – Derlet, Robert – Kost, Gerald J. 200. Point-of-Care Testing for Pandemic Influenza and Biothreats. Review. *Disaster Medicine and Public Health Preparedness* 3(2), 193–202.

Mackay, I. M. 2007. Real-time PCR in microbiology: from diagnosis to characterization. 190–191, 416.

Medix Biochemica. Actim™ Influenza A&B. Kvalitatiivinen testi influenssavirus A:n ja B:n toteamiseksi hengitystienäytteistä. Käyttöohje. Luettu 10.10.2011.

NordVal 2009. Protocol for the validation of alternativ microbiological methods. Norja. Verkkodokumentti. Päivitetty 24.3.2009. <<http://www.nmkl.org/NordVal/NordValprotocolmarch2009.pdf>>. Luettu 26.4.2011.

Poddar, S. – Sawyer, M. – Connor, J. 1998. Effect of inhibitors in clinical specimens on *Taq* and *Tth* DNA polymerase-based PCR amplification of influenza A virus. *Journal of Medical Microbiology* 47, 1131–1135, The Pathological Society of Great Britain and Ireland.

Qiagen 2010. OneStep RT-PCR Kit Handbook. For fast and highly sensitive one-step RT-PCR. Reagenssiohje. Luettu 22.9.2011.

Steininger, C. – Redlberger, M. – Graninger, W. – Kundi, M. – Popow-Kraupp, T. 2009. Near-patient assays for diagnosis of influenza virus infection in adult patients. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 15: 267–273. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19183404>>. Luettu 15.6.2011.

Subbarao, K. – Katz, J. M. 2004. Biology of negative strand RNA viruses: the power of reverse genetics, *Nide* 283: 314. Springer.

Suominen, Ilari – Ollikka, Pauli 2003. Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. Hakapaino Oy, Helsinki, 61–65.

Suominen, Ilari – Pärssinen, R. – Haajanen, Kari – Pelkonen, Jani 2010. Geenitekniikka. Turun Ammattikorkeakoulu, Turku.

Templeton, K. – Scheltinga, S. – Beersma, M. – Kroes, A. – Claas, E. 2004. Rapid and

Sensitive Method Using Multiplex Real-Time PCR for Diagnosis of Infections by Influenza A and Influenza B Viruses, Respiratory Syncytial Virus, and Parainfluenza Viruses 1, 2, 3, and 4. *Journal of Clinical Microbiology* 42:4, 1564–1569. American Society for Microbiology.

Terveysten ja hyvinvoinnin laitos 2011. Verkkodokumentti. <www.thl.fi>. Luettu 26.8.2011.

Ulmanen, Ismo – Tenhunen, Jukka – Yläne, Jari – Valste, Juha – Viitanen, Pertti 2000. *Genetik, Biologi för gymnasiet*, 70. Söderström & C:o Förlags Ab.

Ulmanen, Minna 2010. Virusnäytteenotto ja kuljetus. HUSLAB Virologian osasto. Moodi 1/2010, 26.

Van Tam, Jonathan – Shellwood, Chloe 2009. Introduction to pandemic influenza. *M Dular Texts*: 3–4.

Viljoen, Gerrit J. – Nel, L. H. – Crowther, J. R. 2005. *Molecular diagnostic PCR handbook*. Springer, 13–14.

Yang, Genyan – Erdman, Dean E. – Kodani, Maja – Kools, John – Bowen, Michael D. – Fields, Barry S. 2010. Comparison of commercial systems for extraction of nucleic acids from DNA/RNA respiratory pathogens. *Journal of Virological Methods* 171, 195–199. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093410003952>>. Luettu 19.7.2011.

Yhtyneet Medix Laboratoriot Oy:n laatima validointisuunnitelma



Yhtyneet Medix laboratoriot

Validointisuunnitelma

Sivu 1(5)

Tuotekehitys/ Influenssa A ja B
Pvm. 27.5.2011/ Johanna Westerlund

Tutkimuksen nimi: Influenssa A ja B, nukleiinihappo (kval)
Tutkimuksen lyhenne: - InfNhO
Tuotantoalue: Mikrobiologia

Vastuuhenkilö(t): Johanna Westerlund

Testauksen luonne: SmartCycler® Flu A/B –määritysmenetelmän validointi

Testauksen tavoitteet: Uuden määritysmenetelmän pystyttäminen

Testauksen ajankohta: toukokuu 2011

Yleistä

Testattavan näytteen RNA eristetään easyMAG-laitteistolla (bioMérieux) jonka jälkeen näytteen eristetty RNA muokataan komplementaariseksi DNA:ksi (cDNA) käänteistranskriptiolla. RNA:n muokkaaminen cDNA:ksi ja cDNA:n monistaminen tapahtuu ns. one-step menetelmällä (Qiagen). Näytteet monistetaan Influenssa A ja Influenssa B spesifisten alukkeiden avulla. Monistettu tuote detektoidaan koettimilla, jotka ovat leimattu fluoresoivilla molekyyleillä. Näytteen monistaminen ja detektio tapahtuu SmartCycler® laitteen ja ohjelmiston avulla.

Jokaisessa näytteessä on mukana sisäinen kontrolli mahdollisen PCR-inhibition havaitsemiseksi.

Tutkittavan menetelmän toiminta perustuu TaqMan®-menetelmään. Influenssa A:tä tunnistavan koettimen 5'-päässä on fluorofori, FAM™ (fluoresiini) ja Influenssa B:tä tunnistavan koettimen 5'-päässä on fluorofori, Alexa Fluor® 532, molempien koettimien 3'-päässä on fluoresenssia estävä vaimennin.

Laitteen soveltuvuuden arviointi

SmartCycler®-laitteen toimivuus on testattu jo useammassa yhteydessä (ks. IDI-MRSA validointiraportti 2006). Laitteen kalibroinnin tarkastus suoritetaan kerran vuodessa (suoritettu 2/2011). EasyMAG-eristyslaite verifioitu limakalvonäytteille laitehankinnan yhteydessä (ks. easyMAG verifiointiraportti 2008). RNA-eristys verifioitu ulosteen Norovirus-näytteillä, (Generic, 200 µl näytettä, on-board lyysis, eluointivolyymi 60 µl).

Testauksessa käytettävä materiaali ja testausosiot

1. Kontrollinäytteet

THL:n näytteet

3. Menetelmävertailu

- Määritetään influenssa antigeenitestillä (Actim Influenza A&B, Medix Biochemica) analysoituja nenä- ja suoläytettä RT-PCR-menetelmällä (Cepheidin SmartCycler® Flu A/B).
- negatiiviseksi seulottuja näytteitä (n=50)
 - Influenssa A-positiivisia näytteitä (n = 15) (THL:n IA(H3N2) 5 kpl, IA(H1N1)v 5 kpl ja Ag-pos 5 kpl)
 - Influenssa B-positiivisia näytteitä (n = 10) (THL:n IB+ 5 kpl ja Ag-pos 5 kpl)

4. Spesifisyyden testaaminen

- THL:n potilasnäytteillä (n=50)
- 5 sikainfluenssa positiivista
 - 5 tavallista H3N2 viruspositiivista
 - 5 influenssa B viruspositiivista
 - 20 negatiivista (joissa parainfluenssaa, RSV:tä tai adenoa) poolattuna 1+1 yhteensä 10 poolattua näytettä.



Tuotekehitys/ Influenssa A ja B
Pvm. 27.5.2011/ Johanna Westerlund

Validointisuunnitelma
Sivu 2(5)

5. Herkkyyden ja lineaarisuuden testaaminen

Laimennossarja: 1:1, 1:10 ja 1:100 (1:1000)

- Influenssa A positiivisella ja
- Influenssa B positiivisella näytteellä

Testiä: 120 kpl

6. RNA-pitoisuuden määrittäminen

RNA-pitoisuuden mittaaminen Qubit:illa

Taulukko 1.	Suunnitelma	Toteutunut/pvm
Menetelmävertailu	X	
Spesifisyys (Specificity)	X	
Herkkyys (Sensitivity)	X	
Viitearvot ja niiden jäljitettävyys	X	
Laatutavoitteiden toteutumisen ja teknisen suorituksen ja laitteen soveltuvuuden arviointi	X	
Kannattavuuden arviointi	X	
Kliinisen soveltuvuuden arviointi / Vastaamiskäytännöt / Eettiset keskustelut / Laitteen soveltuvuuden arviointi	X	
Asiakastiedottaminen (asiakastiedote/tuoteinfo/ YML-kotisivut)	X	
Finas-tiedottaminen	X	
Tietohallinto: Laiteliitännät ja laboratoriojärjestelmä / vastausraportin arviointi	X	
Tuotehallinta: Tuoteluettelo / laskutusjärjestelmä	X	
Työ-/toiminta-/laiteohjeiden laatiminen	X	
EQA-kierrosten valinta	X	
Henkilöstön perehdytys	X	
Muutoksen toteuttaminen tuotannossa	X	

Validointisuunnitelma hyväksytty
(pvm / allekirjoitus)

____/____/____ mikrobiologian erikoislääkäri

Validointisuunnitelma hyväksytty
(pvm / allekirjoitus)

____/____/____ lääketieteellinen johtaja

SmartCycler® RT-PCR-sarjat

Sarja 1

Näyte 1	Näyte 2	Näyte 3	Näyte 4	Näyte 5	Näyte 6	Näyte 7	Näyte 8
THL neg 756+757 RSV+neg	THL neg 758+759	THL neg 760+761 AD+AD	THL neg 763+764	THL neg 765+767 neg+AD	THL neg 768+769	THL neg 770+771	THL neg 772+773
Näyte 9	Näyte 10	Näyte 11	Näyte 12	Näyte 13	Näyte 14	Näyte 15	Näyte 16
THL neg 774+775	THL neg 776+777 AD+AD	THL A (H3N2) 1038	THL A (H3N2) 42	THL B 628	Actim A DX093080	Actim neg DX092361	Neg. kontr. (H ₂ O)

Sarja 2

Näyte 1	Näyte 2	Näyte 3	Näyte 4	Näyte 5	Näyte 6	Näyte 7	Näyte 8
THL A (H3N2) 145	THL A (H1N1) 467	THL B 636	Actim A DX092392	Actim A DX094003	Actim A DX093248	Actim A DX093094	Actim B DX092990
Näyte 9	Näyte 10	Näyte 11	Näyte 12	Näyte 13	Näyte 14	Näyte 15	Näyte 16
Actim B DX091804	Actim B DX092849	Actim B DX093235	Actim neg DX091732	Actim neg DX092252	Actim neg DX092270	Actim neg DX092012	Neg. kontr. (H ₂ O)

Sarja 3

Näyte 1	Näyte 2	Näyte 3	Näyte 4	Näyte 5	Näyte 6	Näyte 7	Näyte 8
THL A (H3N2) 146	THL B 644	THL A (H1N1) 485	THL A (H1N1) 496	THL A (H1N1) 532	THL A (H1N1) 550	Actim neg DX092035	Actim neg DX092068
Näyte 9	Näyte 10	Näyte 11	Näyte 12	Näyte 13	Näyte 14	Näyte 15	Näyte 16
Actim neg DX093103	Actim neg DX091798	Actim neg DX091653	Actim neg DX091758	Actim neg DX096615	Actim neg DX096614	Actim neg DX096422	Neg. kontr. (H ₂ O)

Sarja 4

Näyte 1	Näyte 2	Näyte 3	Näyte 4	Näyte 5	Näyte 6	Näyte 7	Näyte 8
THL A (H3N2) 165	THL B 651	THL A (H1N1) 467 1:1	THL A 467 1:10	THL A 467 1:10	THL A 467 1:100	THL A 467 1:100	THL A 467 1:1000
Näyte 9	Näyte 10	Näyte 11	Näyte 12	Näyte 13	Näyte 14	Näyte 15	Näyte 16
THL A (H1N1) 467 1:1000	THL B 705	Actim neg DX091744	Actim neg DX093116	Actim neg DX093093	Actim neg DX092857	Actim neg DX093167	Neg. kontr. (H ₂ O)

Sarja 5

Näyte 1	Näyte 2	Näyte 3	Näyte 4	Näyte 5	Näyte 6	Näyte 7	Näyte 8
THL A (H1N1) 467	THL B 644	THL A (H3N2) 145 1:1	THL A (H3N2) 145 1:10	THL A (H3N2) 145 1:10	THL A (H3N2) 145 1:100	THL A (H3N2) 145 1:100	THL A (H3N2) 145 1:1000
Näyte 9	Näyte 10	Näyte 11	Näyte 12	Näyte 13	Näyte 14	Näyte 15	Näyte 16
THL A (H3N2) 145 1:1000	Actim A & B DX095740	THL A uusinta 146	Actim A uusinta DX092392	Actim neg DX092825	Actim neg DX092994	Actim neg DX092995	Neg. kontr. (H ₂ O)

Sarja 6

Näyte 1	Näyte 2	Näyte 3	Näyte 4	Näyte 5	Näyte 6	Näyte 7	Näyte 8
THL B 644	THL A (H3N2) 145	Actim A & B DX101119	Actim neg DX092694	Actim neg DX092950	Actim neg DX092823	Actim neg DX092824	Actim neg DX092978
Näyte 9	Näyte 10	Näyte 11	Näyte 12	Näyte 13	Näyte 14	Näyte 15	Näyte 16
Actim neg DX093466	Actim neg DX093269	Actim neg DX092812	Actim neg DX092756	Actim neg DX093469	Actim neg DX093079	Actim neg DX093201	Neg. kontr. (H ₂ O)

Sarja 7

Näyte 1	Näyte 2	Näyte 3	Näyte 4	Näyte 5	Näyte 6	Näyte 7	Näyte 8
THL A (H3N2) 145	Actim neg DX093055	Actim neg DX093718	Actim neg DX093748	Actim neg DX093769	Actim neg DX093790	Actim neg DX093783	Actim neg DX093970
Näyte 9	Näyte 10	Näyte 11	Näyte 12	Näyte 13	Näyte 14	Näyte 15	Näyte 16
Actim neg DX093997	Actim neg DX096364	Actim neg DX096437	Actim neg DX096429	Actim neg DX096627	Actim neg DX096624	Actim neg DX096635	Neg. kontr. (H ₂ O)

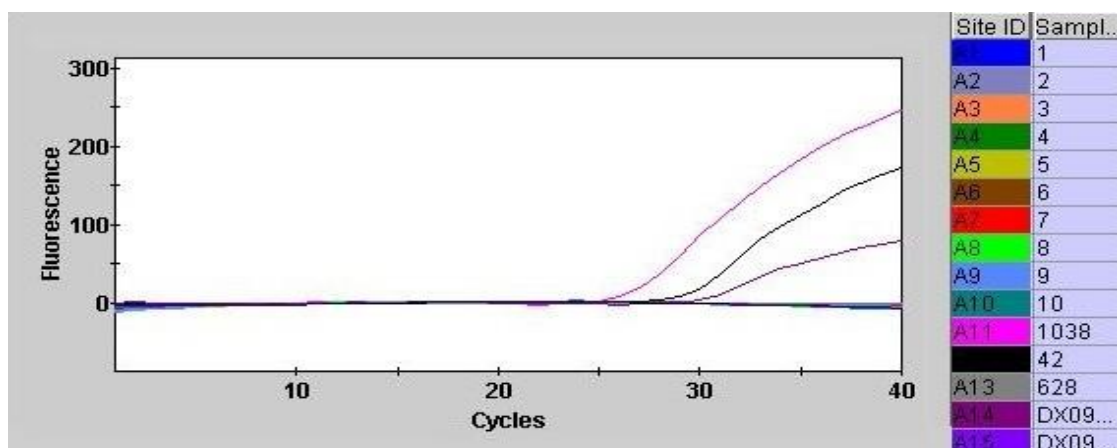
Sarja 8

Näyte 1	Näyte 2	Näyte 3	Näyte 4	Näyte 5	Näyte 6	Näyte 7	Näyte 8
THL B 644 1:1	THL B 644 1:10	THL B 644 1:10	THL B 644 1:100	THL B 644 1:100	THL B 644 1:1000	THL B 644 1:1000	Neg. kontr. (H ₂ O)

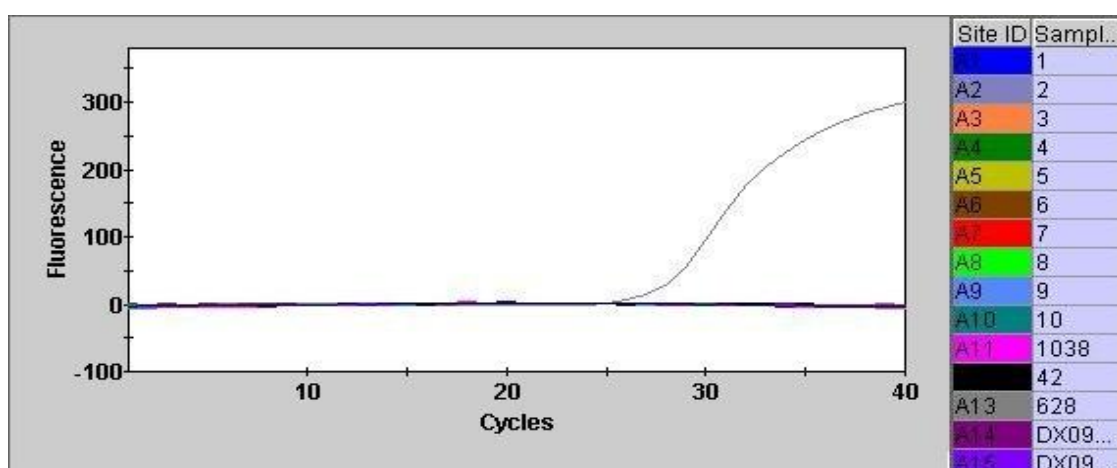
Qiagen® One-Step RT-PCR-reagenssipakkauksen sisältö

Tuotenimi	LOT	Mat. No.	Selitys
5x Qiagen® OneStep RT-PCR Buffer 5x 12,5 mM MgCl ₂	136264203	1012889	PCR-puskuri
dNTP Qiagen dNTP-Mix 10 mM	136266218	1005631	Nukleotidit
Enzyme Mix Qiagen One Step Enzyme Mix 2 µl/reaktio	136260998	1012890	Entsyymiseos (käänteisko- pioija- ja Taq- polymeraasientsyymit)
H ₂ O RNase-free Water 1,9 ml	136267254	1012888	Steriili vesi

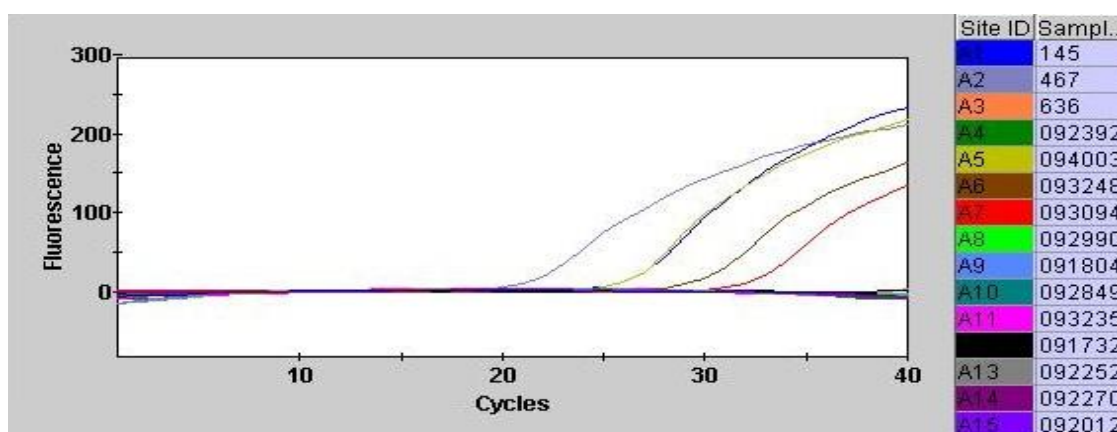
Smart Cycler® RT-PCR-tulosten signaalikäyrät



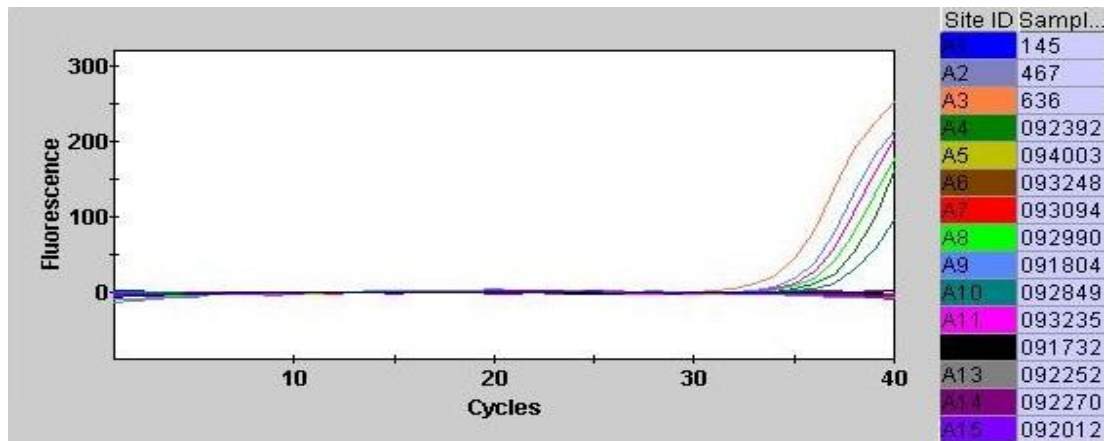
Kuvio 1. Signaalikäyrät influenssa A-positiivisille näytteille sarjassa 1.



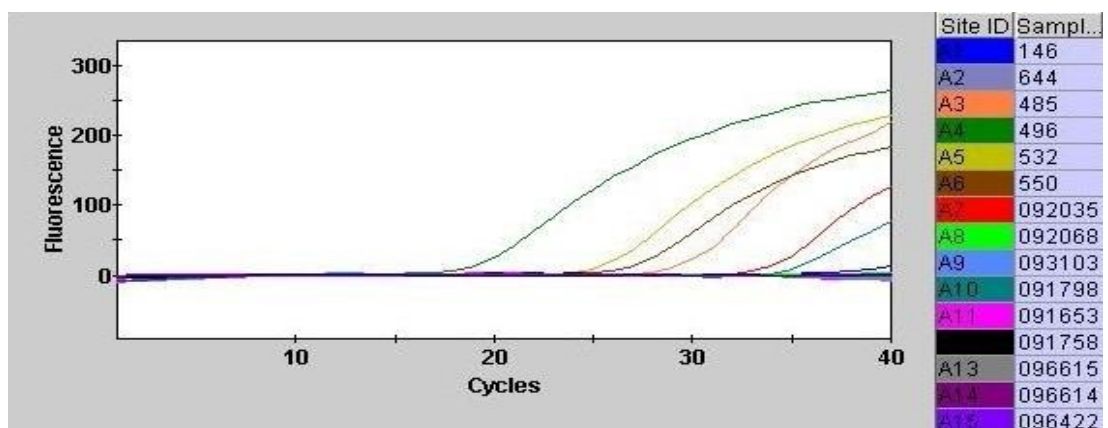
Kuvio 2. Signaalikäyrät influenssa B-positiivisille näytteille sarjassa 1.



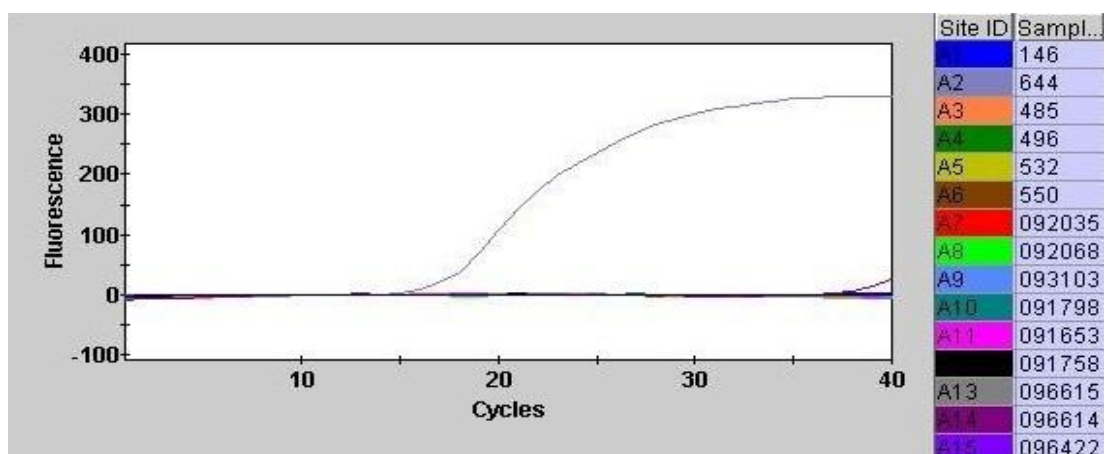
Kuvio 3. Signaalikäyrät influenssa A-positiivisille näytteille sarjassa 2.



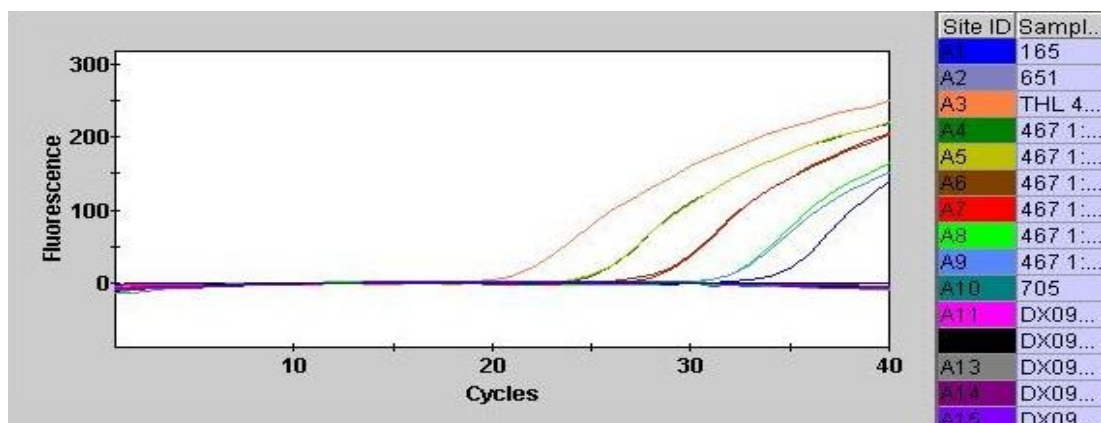
Kuvio 4. Signaalikäyrät influenssa B-positiivisille näytteille sarjassa 2.



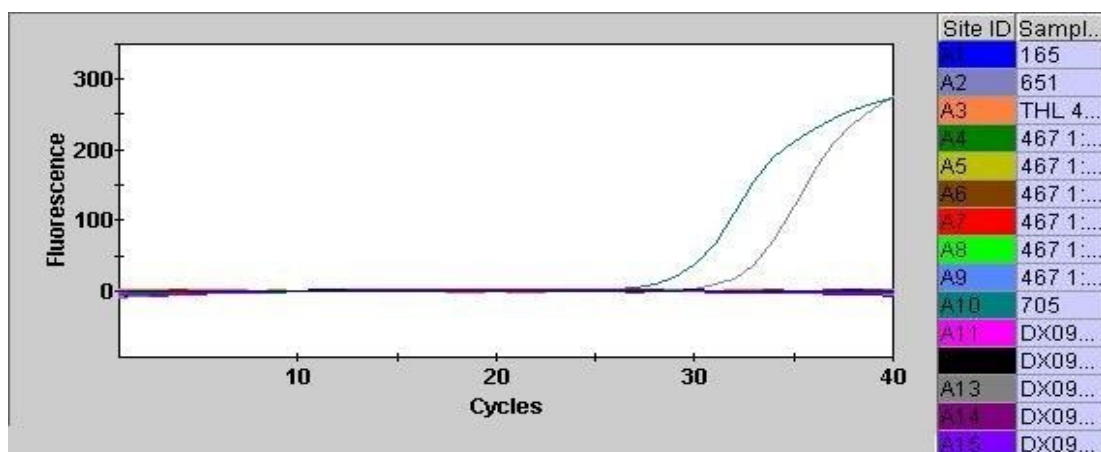
Kuvio 5. Signaalikäyrät influenssa A-positiivisille näytteille sarjassa 3.



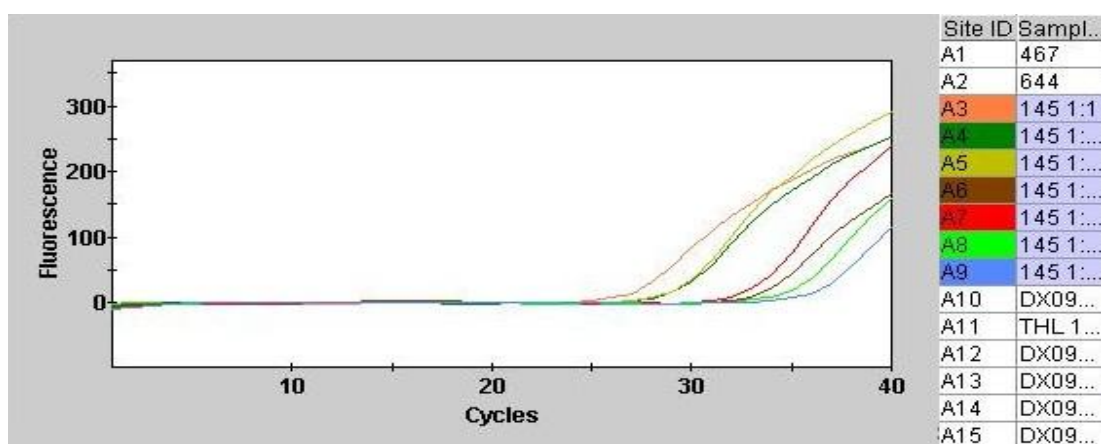
Kuvio 6. Signaalikäyrät influenssa B-positiivisille näytteille sarjassa 3.



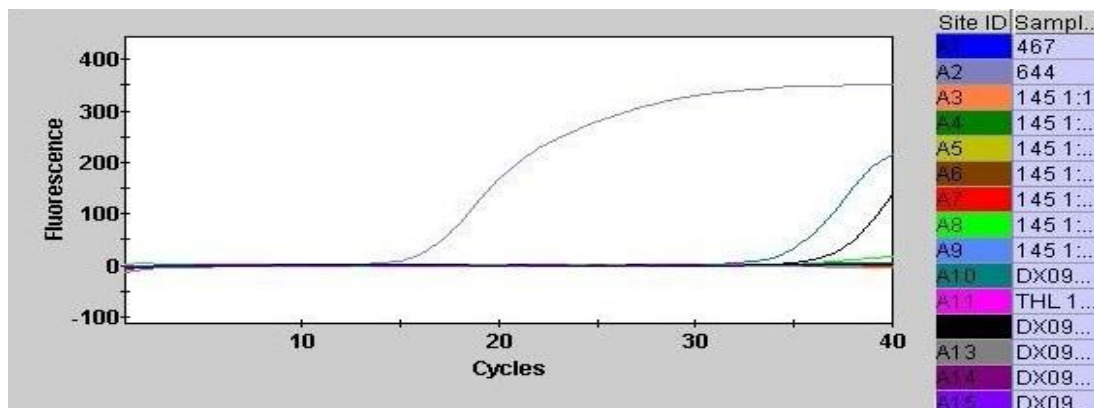
Kuvio 7. Signaalkäyrät influenssa A-positiivisille näytteille sarjassa 4.



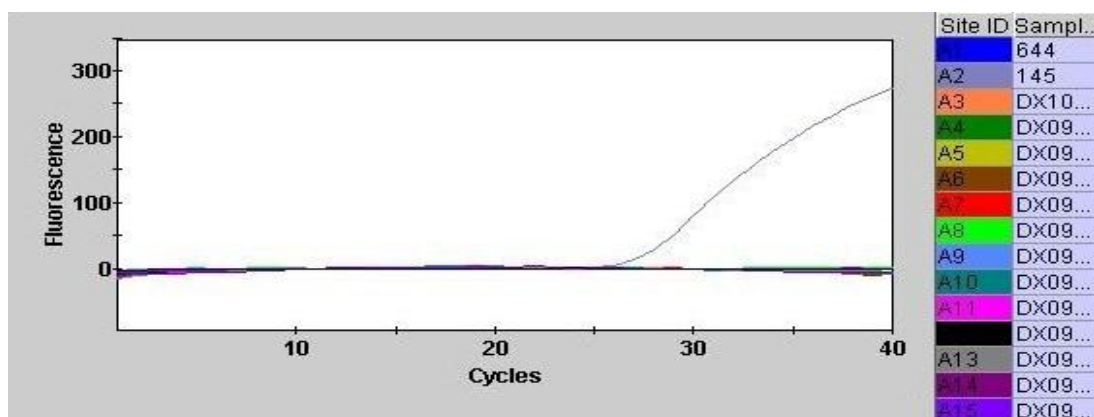
Kuvio 8. Signaalkäyrät influenssa B-positiivisille näytteille sarjassa 4.



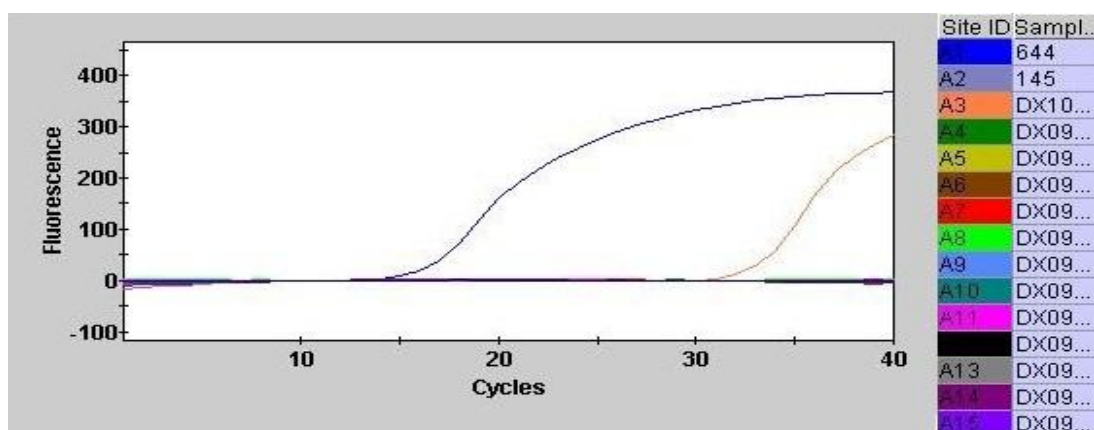
Kuvio 9. Signaalkäyrät influenssa A-positiivisille näytteille sarjassa 5.



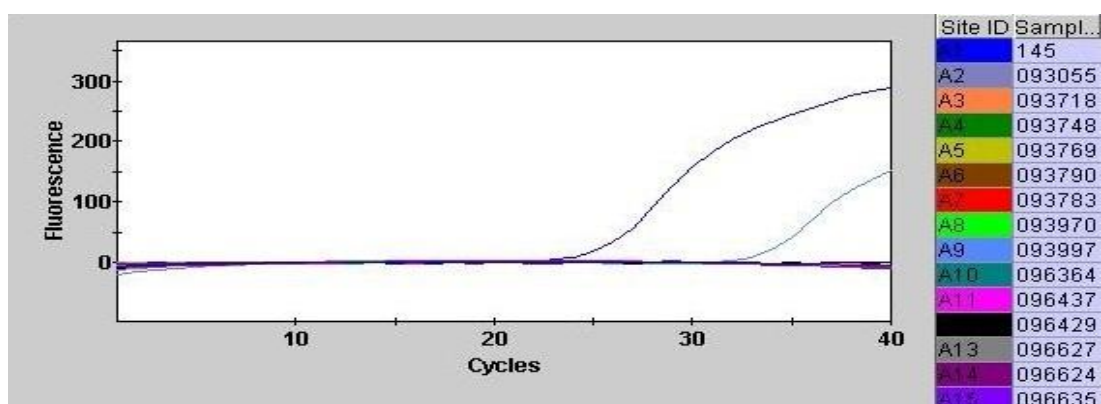
Kuvio 10. Signaalikäyrät influenssa B-positiivisille näytteille sarjassa 5.



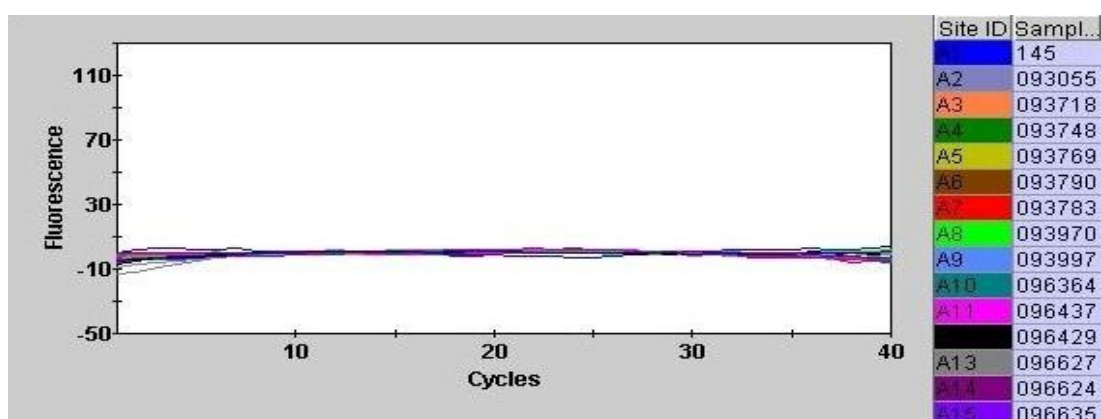
Kuvio 11. Signaalikäyrät influenssa A-positiivisille näytteille sarjassa 6.



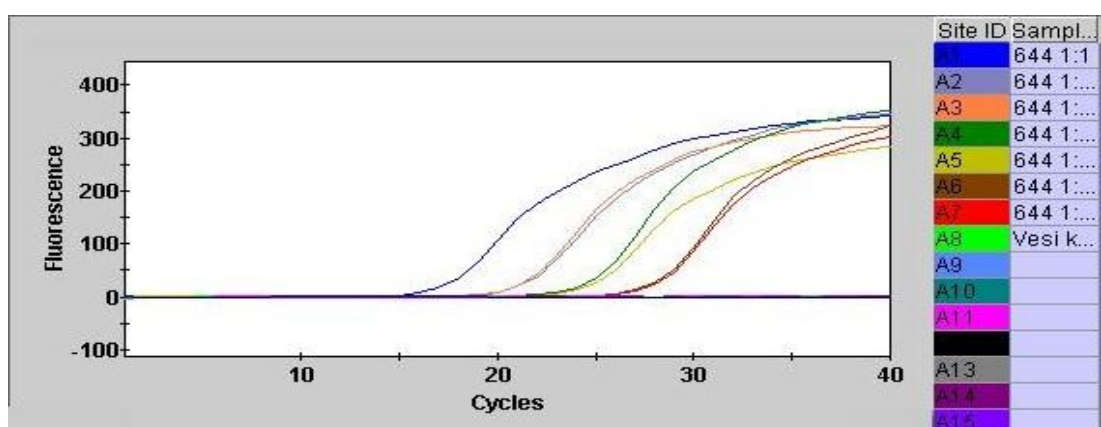
Kuvio 12. Signaalikäyrät influenssa B-positiivisille näytteille sarjassa 6.



Kuvio 13. Signaalikäyrät influenssa A-positiivisille näytteille sarjassa 7.



Kuvio 14. Signaalikäyrät influenssa B-positiivisille näytteille sarjassa 7.



Kuvio 8. Signaalikäyrät influenssa B-positiivisille näytteille sarjassa 8. Aikaisemmin vahvaksi positiiviseksi influenssa B-virusnäytteeksi todettu näyte (644) laimennettiin menetelmän lineaarisuuden osoittamiseksi.

Smart Cycloer® RT-PCR-tulokset sarjoittain

Sarja 1					
Näyttenumero	Smart Cycloer®	Ct-arvo	SPC Ct-arvo	Actim Influenza A&B	THL
THL 756+757	neg	0	0	-	RSV+neg
THL 758+759	neg	0	0	-	neg+neg
THL 760+761	neg	0	0	-	AD+AD
THL 763+764	neg	0	0	-	neg+neg
THL 765+767	neg	0	0	-	neg+AD
THL 768+769	neg	0	0	-	neg+neg
THL 770+771	neg	0	0	-	neg+neg
THL 772+773	neg	0	0	-	neg+neg
THL 774+775	neg	0	0	-	neg+neg
THL 776+777	neg	0	0	-	AD+AD
THL 1038	A	27,55	0	-	A
THL 42	A	30,63	0	-	A
THL 628	B	28,04	0	-	B
DX093080	A	32,67	0	A	-
DX092361	neg	0	0	neg	-
H2O	neg	0	0	-	-
Sarja 2					
Näyttenumero	Smart Cycloer®	Ct-arvo	SPC Ct-arvo	Actim Influenza A&B	THL
THL 145	A	27,32	0	-	A
THL 467	A	22,72	37,59	-	A
THL 636	B	34,36	0	-	B
DX092392	B	37,20	0	A	-
DX094003	A	27,23	0	A	-
DX093248	A	30,99	0	A	-
DX093094	A	33,57	0	A	-
DX092990	B	36,49	0	B	-
DX091804	B	35,58	0	B	-
DX092849	B	38,04	0	B	-
DX093235	B	36,08	0	B	-
DX091732	neg	0	0	neg	-
DX092252	neg	0	0	neg	-
DX092270	neg	0	0	neg	-
DX092012	neg	0	0	neg	-
H2O	neg	0	37,79	-	-

Sarja 3					
Näytenumero	Smart Cycler®	Ct-arvo	SPC Ct-arvo	Actim Influenza A&B	THL
THL 146	neg	0	39,19	-	A
THL 644	B	17,50	0	-	B
THL 485	A	30,45	0	-	A
THL 496	A	20,34	0	-	A
THL 532	A	26,65	0	-	A
THL 550	A	28,33	0	-	A
DX092035	A	35,08	0	neg	-
DX092068	neg	0	0	neg	-
DX093103	neg	0	0	neg	-
DX091798	A	36,70	0	neg	-
DX091653	neg	0	0	neg	-
DX091758	neg	0	0	neg	-
DX096615	neg	0	0	neg	-
DX096614	neg	0	0	neg	-
DX096422	neg	0	0	neg	-
H2O	neg	0	36,67	-	-

Sarja 4					
Näytenumero	Smart Cycler®	Ct-arvo	SPC Ct-arvo	Actim Influenza A&B	THL
THL 165	A	35,43	38,80		A
THL 651	B	32,63	39,78	-	B
THL 467 1:1	A	22,56	0	-	A
THL 467 1:10	A	26,38	0	-	A
THL 467 1:10	A	26,30	0	-	A
THL 467 1:100	A	29,49	0	-	A
THL 467 1:100	A	29,64	0	-	A
THL 467 1:1000	A	33,10	0	-	A
THL 467 1:1000	A	33,27	0	-	A
THL 705	B	29,60	0	-	B
DX091744	neg	0	39,13	neg	-
DX093116	neg	0	0	neg	-
DX093093	neg	0	0	neg	-
DX092857	neg	0	0	neg	-
DX093167	neg	0	38,04	neg	-
H2O	neg	0	37,95	-	-

Sarja 5					
Näytenumero	Smart Cycler®	Ct-arvo	SPC Ct-arvo	Actim Influenza A&B	THL
THL 467	A	22,93	0	-	A
THL 644	B	16,40	0	-	B
THL 145 1:1	A	27,96	0	-	A
THL 145 1:10	A	29,85	0	-	A
THL 145 1:10	A	29,72	0	-	A
THL 145 1:100	A	34,35	0	-	A
THL 145 1:100	A	33,43	0	-	A
THL 145 1:1000	A	35,66	0	-	A
THL 145 1:1000	A	37,04	0	-	A
DX095740	B	34,91	0	A+B	-
THL 146	A	37,84	0	-	A
DX092392	B	37,24	0	A	-
DX092825	neg	0	39,46	neg	-
DX092994	neg	0	0	neg	-
DX092995	neg	0	38,24	neg	-
H2O	neg	0	37,53	-	-

Sarja 6					
Näytenumero	Smart Cycler®	Ct-arvo	SPC Ct-arvo	Actim Influenza A&B	THL
THL 644	B	16,53	0	-	B
THL 145	A	28,05	0	-	A
DX101119	B	33,07	0	A+B	-
DX092694	neg	0	0	neg	-
DX092950	neg	0	0	neg	-
DX092823	neg	0	37,28	neg	-
DX092824	neg	0	39,00	neg	-
DX092978	neg	0	0	neg	-
DX093466	neg	0	37,42	neg	-
DX093269	neg	0	0	neg	-
DX092812	neg	0	0	neg	-
DX092756	neg	0	39,39	neg	-
DX093469	neg	0	0	neg	-
DX093079	neg	0	0	neg	-
DX093201	neg	0	38,74	neg	-
H2O	neg	0	38,64	-	-

Sarja 7					
Näytenumero	Smart Cycler®	Ct-arvo	SPC Ct-arvo	Actim Influenza A&B	THL
THL 145	A	25,78	0	-	A
DX093055	neg	0	36,35	neg	-
DX093718	neg	0	0	neg	-
DX093748	neg	0	0	neg	-
DX093769	neg	0	0	neg	-
DX093790	neg	0	0	neg	-
DX093783	neg	0	0	neg	-
DX093970	neg	0	0	neg	-
DX093997	A	34,45	37,39	neg	-
DX096364	neg	0	38,89	neg	-
DX096437	neg	0	0	neg	-
DX096429	neg	0	38,08	neg	-
DX096627	neg	0	38,64	neg	-
DX096624	neg	0	0	neg	-
DX096635	neg	0	0	neg	-
H2O	neg	0	35,58	-	-

Sarja 8					
Näytenumero	Smart Cycler®	Ct-arvo	SPC Ct-arvo	Actim Influenza A&B	THL
THL 644 1:1	B	17,73	0	-	B
THL 644 1:10	B	21,60	0	-	B
THL 644 1:10	B	21,44	0	-	B
THL 644 1:100	B	24,75	0	-	B
THL 644 1:100	B	25,18	0	-	B
THL 644 1:1000	B	28,17	0	-	B
THL 644 1:1000	B	28,34	0	-	B
H2O	neg	0	0	-	-